



PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE LÍPIDOS ESTRUTURADOS, RICOS EM ÁCIDOS GORDOS POLINSATURADOS ÓMEGA-3, EM REACTOR DE ALTA PRESSÃO

Joana Mendes Madeira Rodrigues

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientador: Doutora Maria Suzana Leitão Ferreira Dias Vicente

Co-orientador: Doutora Natália Maria Ferreira Rebelo de Melo Osório

Júri:

Presidente: - Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: - Doutora Maria Henriques Lourenço Ribeiro, Professora Associada da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa;

- Doutora Maria Suzana Leitão Ferreira Dias Vicente, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

- Doutora Natália Maria Ferreira Rebelo de Melo Osório, Professora Auxiliar Convidada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Lisboa, 2011

AGRADECIMENTOS

Um especial agradecimento à Professora Suzana Ferreira Dias pelas preciosas orientações facultadas no decorrer deste trabalho, pelo seu optimismo e permanente disponibilidade.

À Professora Natália Osório, pelo co-orientação desta tese e pelos conhecimentos transmitidos especialmente durante a fase laboratorial do trabalho.

À Professora Maria Henriques pelo apoio, durante a realização dos ensaios de interesterificação a altas pressões na FFUL.

Agradeço também ao Professor Alfaia e ao Doutor Hélder, da FFUL, sempre prontos para me auxiliarem com o vaso das altas pressões.

A todos os elementos docentes e não docentes do Departamento de Agro-Indústrias do ISA e à D. Noémia do laboratório de Química-Física da FFUL.

À FIMA/VG, Produtos Alimentares, Lda, pelo apoio prestado ao fornecerem de forma gratuita os óleos e gorduras utilizados neste trabalho e por terem disponibilizado o aparelho de NMR.

À Novozymes A/S (Dinamarca) pelo fornecimento dos biocatalisadores “Lipozyme TL IMTM”, “Lipozyme RM IMTM” e “Novozym 435TM” e à EPAX, AS (Noruega) pelo fornecimento do “EPAX 4510TG”, sem os quais este trabalho não teria sido possível.

E por último, à minha família, amigos e colegas, especialmente à minha mãe, que sempre me ajudou e apoiou incondicionalmente em todos os momentos da minha vida.

RESUMO

Com este trabalho pretendeu-se estudar o efeito das altas pressões na cinética da interesterificação enzimática de misturas reaccionais de estearina de palma (PS), óleo de palmiste (PK) e um concentrado de triacilgliceróis enriquecido em ácidos gordos polinsaturados ómega-3 (*n*-3 PUFA) "EPAX 4510 TG", em meio livre de solvente.

A interesterificação de gorduras permite melhorar as suas propriedades físicas e funcionais, através da modificação do perfil de triacilgliceróis, produzindo assim lípidos estruturados que podem ser incorporados em margarinas e "shortenings".

As reacções decorreram a 60 °C, à pressão atmosférica (0,1 MPa) e a 25, 50, 75 e 100 MPa. Os 4 biocatalisadores ("Lipozyme RMIMTM", "Lipozyme TLIMTM", "Novozym 435TM" e a lipase/aciltransferase de *C. parapsilosis*) foram reutilizados em 6 "batches" consecutivos de 3h, com meio fresco.

A actividade de interesterificação foi acompanhada através das alterações no teor de gordura sólida a 35 °C (SFC_{35°C}) da mistura reaccional. A "Lipozyme RMIMTM" e a lipase/aciltransferase diminuíram a sua actividade com o aumento da pressão. Já as lipases "Lipozyme TLIMTM" e "Novozym 435TM" aumentaram a sua actividade. Os melhores resultados em termos de estabilidade operacional foram observadas para a "Lipozyme TLIMTM". Neste trabalho também se determinaram os ácidos gordos livres (FFA) e os produtos de oxidação.

Palavras-chave: Ácidos gordos polinsaturados ómega-3, altas pressões, interesterificação, lipases imobilizadas, lípidos estruturados.

ABSTRACT

The aim of this work was to study the effect of high pressure in the enzyme-catalyzed interesterification kinetics of ternary blends of palm stearin (PS), palm kernel oil (PK) and triacylglycerols rich in omega-3 polyunsaturated fatty acids (*n*-3) PUFA ("EPAX 4510 TG", EPAX AS, Norway), carried out in solvent free medium, batchwise. The interesterification of natural blends will improve certain physical and nutraceutical properties by modification of their acylglycerol profile, creating structured lipids to be incorporated in margarines and shortenings. Reactions were carried out at 60 °C at atmospheric pressure (0,1 MPa) and at 25, 50, 75 and 100 MPa. The 4 biocatalysts ("Lipozyme RMIMTM", "Lipozyme TLIMTM"; "Novozym 435TM" and the lipase/acyltransferase from *C. parapsilosis*) were reused in consecutive 3h-batches, in a total of 6 batches, using fresh medium. The interesterification activity was accompanied by changes in the solid fat content at 35 °C (SFC_{35 °C}). "Lipozyme RMIMTM" and the lipase/acyltransferase decreased their activity with increasing pressure. Conversely, "Lipozyme TLIMTM" and "Novozym 435TM" increased their activity with increasing pressure. The best results in terms of operational stability were observed for "Lipozyme TLIMTM". In this work, free fatty acids (FFA) and oxidation products were also assayed.

Keywords: High pressure, immobilized lipase, interesterification, omega-3 polyunsaturated fatty acids, structured lipids.

LONG ABSTRACT

In the last years, the production of structured lipids (SLs) or “tailor made fats”, with desired physical and chemical properties and/or nutritional benefits, has greatly increased. The functional properties of fats are determined by their fatty acid composition and by the distribution pattern of fatty acids in triacylglycerols (TAGs). By rearranging the acyl residues on the acylglycerol backbone, it is possible to modify the acylglycerol profile. Particularly, the production of SLs enriched in omega-3 polyunsaturated fatty acids (*n*-3 PUFA), such as eicosapentaenoic acid (EPA 20:5(*n*-3)) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6(*n*-3)), has had a great development due to their known benefits in human health, namely the prevention of heart diseases, therapeutic effect on acute and chronic inflammatory diseases, and vital effects on neurological development (including cognitive function) and mental health. These SLs can be incorporated in margarines, shortenings and other fat products.

The improvement of physical properties of fat blends (e.g. melting point, solid fat content (SFC)) is also achieved by modification of the acylglycerol pattern. In the manufacturing of margarine, “plastic fats” can be produced by hydrogenation, fractionation or interesterification. The hydrogenation process leads to the conversion of polyunsaturated fatty acids into saturated fatty acids, with consequent loss of essential fatty acids, as well as leading to the formation of *trans* fatty acids, which cause health problems. Currently, the hydrogenation is being abandoned in favor of chemically or lipase catalyzed interesterification. It consists in the exchange of acyl groups between molecules of TAGs, with modification of rheological properties of fat without changing their fatty acid composition.

In the field of oils and fats, the use of lipases as catalysts for the production of SLs with functional and specific properties has greatly increased during the last decades. Lipases are enzymes which catalyze the hydrolysis of esters in aqueous medium. However, when these enzymes are in organic media with low water activity(a_w), they catalyze both esterification and interesterification reactions.

In industry, chemical interesterification is carried out in the presence of a metal catalyst, and consists in the interchange of acyl groups at random, leading to the formation of a considerable amount of side products. In the contrary, enzymatic interesterification with *n*-1,3 specific lipases creates TAGs that are regiospecifically modified or restructured to meet special functions, with higher yields. The use of lipases as biocatalysts for the production of SLs has other important benefits besides regiospecificity: (i) availability of lipases from a wide range of sources, (ii) the efficiency of lipases under mild conditions

(temperature < 70°C), (iii) reducing energetic costs, natural process and (iv) reduced environmental pollution (Xu, 2000).

Many factors influence the activity and stability of enzymes: temperature, a_w , pressure and the presence of inhibitors of enzyme activity (e.g. products of lipid oxidation and free fatty acids (FFA)). High pressure has been ascribed to inactivate lipases. In fact, pressure can activate or inhibit enzymatic activities, depending on the proteins and conditions. It can also modify the rate-limiting step, or modulate the enzyme selectivity.

The aim of this work was to study the effect of high pressure in the enzyme-catalyzed interesterification kinetics of ternary blends of palm stearin (PS), palm kernel oil (PK) and triacylglycerols rich in $n-3$ PUFA ("EPAX 4510 TG", EPAX AS, Norway). The interesterification reaction was carried out in solvent free medium, batchwise, at 60 °C, at atmospheric pressure (0,1 MPa) and at 25, 50, 75 and 100 MPa. Three commercial immobilized lipases ("Lipozyme RM IMTM", "Lipozyme TL IMTM", "Novozym 435TM") and the lipase/acyltransferase from *Candida parapsilosis* immobilized on Accurel MP 1000 were reused in consecutive 3h-batches, in a total of 6 batches, using fresh medium. "LipozymeTM RM IM" and "LipozymeTM TL IM" incorporate $n-3$ PUFA in $n-1,3$ specific positions, keeping the fatty acids in position $n-2$ (Xu, 2000). Lipase "Novozym 435TM" has a specificity that depends on the substrate where it operates. In some reactions this enzyme acts as a nonspecific lipase, while in other reactions reveals a positional specificity ($n-1, 3$).

As in the food industry, the interesterification activity of the biocatalysts was accompanied by changes in the solid fat content at 35°C (SFC_{35 °C}). The SFC_{35 °C} is particularly important for table margarines since it is related to the extent of melting in the mouth, and must be as low as possible, to prevent a sandy texture. "Lipozyme RM IMTM" and the lipase/acyltransferase decreased their catalytic activity with increasing pressure. Conversely, "Lipozyme TL IMTM" and "Novozym 435TM" increased their activity with increasing pressure. The best results in terms of operational stability studies were observed for "Lipozyme TL IMTM".

In this work, FFA and oxidation products were also assayed. The presence of FFA in the reaction mixture, has been a limiting factor in getting better yields in comparison with the traditional method of chemical interesterification. The levels of FFA in reaction mixtures interesterified at high pressures were very similar to the levels of FFA in reaction mixtures interesterified at atmospheric pressure. As such, we can conclude that the pressure did not influence this parameter

With respect to first and final oxidation products, the levels were higher in the reaction mixtures interesterified at high pressures than in those interesterified at atmospheric pressure. It can be concluded that pressure promoted changes in the structure of the fat through an unknown mechanism that leads to the formation of compounds, which absorb in the same wavelength of the oxidation products.

This preliminary study showed that interesterification catalyzed by immobilized enzymes, can be an alternative to the traditional process of chemical interesterification. It also demonstrated that it is possible to perform enzymatic interesterification under conditions generally regarded as unfavorable for enzymatic activity. This environmentally friendly process improves enzymatic activity; modifies the selectivity of biocatalysts and allows the synthesis of structured lipids different from those obtained at atmospheric pressure.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	ERRO! MARCADOR NÃO DEFINIDO.
RESUMO	II
ABSTRACT	III
LONG ABSTRACT	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE QUADROS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XII
1. ENQUADRAMENTO DO TEMA: OS LÍPIDOS ESTRUTURADOS.....	1
1.1 OBJECTIVOS.....	4
2 ENQUADRAMENTO TEÓRICO.....	5
2.1 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS GORDURAS	5
2.1.1 PROPRIEDADES QUÍMICAS DAS GORDURAS.....	5
2.1.2 PROPRIEDADES FÍSICAS DAS GORDURAS	8
2.2 TÉCNICAS DE MODIFICAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS GORDURAS.....	14
2.2.1 HIDROGENAÇÃO	14
2.2.2 FRACCIONAMENTO	16
2.2.3 INTERESTERIFICAÇÃO.....	17
2.3 PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM A ACTIVIDADE E ESTABILIDADE ENZIMÁTICAS	24
2.4 MARGARINAS E CREMES DE BARRAR.....	30
2.4.1 A TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO DE MARGARINAS E CREMES DE BARRAR	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 MATERIAIS	35
3.2 MÉTODOS.....	37
3.2.1 ENSAIOS DE INTERESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA À PRESSÃO ATMOSFÉRICA.....	37
3.2.2 ENSAIOS DE REUTILIZAÇÃO DO BIOCATALISADOR À PRESSÃO ATMOSFÉRICA.....	38

3.2.3	ENSAIOS DE INTERESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA EM REACTOR DE ALTA PRESSÃO.....	39
3.2.4	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE GORDURA SÓLIDA A 35 °C.....	41
3.2.5	DETERMINAÇÃO DOS ÁCIDOS GORDOS LIVRES.....	42
3.2.6	DETERMINAÇÃO DOS PRODUTOS DE OXIDAÇÃO PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS.....	43
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1	EFEITOS DA AGITAÇÃO NA CINÉTICA DA REACÇÃO.....	45
4.2	EFEITOS DA PRESSÃO NA ACTIVIDADE DE INTERESTERIFICAÇÃO E NA ESTABILIDADE ENZIMÁTICA.....	47
4.3	EFEITO DA PRESSÃO NA REACÇÃO DE HIDRÓLISE.....	52
4.4	EFEITO DA PRESSÃO NA OXIDAÇÃO DA MISTURA REACCIONAL.....	53
5	CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS.....	56
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Polimorfismo dos triacilgliceróis: forma α (cristais do sistema hexagonal), forma β (cristais do sistema triclínico) e forma β' (cristais do sistema ortorrômbico) (Fonte: Smith, 2008).....	9
Figura 2. Hidrogenação: o hidrogénio gasoso reage com as duplas ligações dos ácidos gordos insaturados [1].....	15
Figura 3. Tipos de reacções catalisadas por lipases (Fonte: Saxena <i>et al.</i> , 1999).....	20
Figura 4. Reacção de interesterificação: (A) com catalisador químico ou catalisador enzimático não específico; (B) com lipase 1,3 específica (Fonte: Macrae, 1983).	21
Figura 5. Esquema geral de fabrico de margarinas (Fonte: Faur, 1996).	32
Figura 6. Reactor de vidro de parede dupla.....	37
Figura 7. Esquema (A) e fotografia (B) do aparelho de alta pressão: vaso de altas pressões (1) , tubo de aço (2), válvula (3), manómetro (4), bomba manual (5), bujão (6), células de reacção (7) e banho termostatzado (8).....	39
Figura 8. Vaso de altas pressões (topo) contendo óleo hidráulico Enerpac HF95Y (A); tubos de propileno com tampa de rosca e capacidade para 7mL de mistura reaccional (B); colocação dos tubos no reactor (C).	39
Figura 9. Ponto de viragem da titulação dos ácidos gordos livres presentes na amostra com uma solução de NaOH 0,1 N, identificável pelo aparecimento de um tom rosa pálido.....	42
Figura 10. Evolução dos valores de SFC _{35 °C} da mistura reaccional ao longo dos sucessivos “batches” de interesterificação catalisados pela “Novozym 435 TM ”, com agitação (A) e sem agitação (B), à pressão atmosférica e a 60 °C.....	45
Figura 11. Evolução da percentagem de redução dos valores de SFC _{35 °C} da mistura reaccional ao longo do tempo (h), durante as sucessivas utilizações da enzima “Novozym 435 TM ” nos ensaios de interesterificação, com agitação (A) e sem agitação (B), à pressão atmosférica e a 60 °C.	46
Figura 12. Evolução da percentagem de redução dos valores de SFC _{35 °C} da mistura reaccional no final de cada “batch” de 3 horas, durante os ensaios de interesterificação,	

catalisados pela enzima “Novozyme 435TM” com agitação (A) e sem agitação (B), à pressão atmosférica e a 60 °C.46

Figura 13. Valores de SFC_{35 °C} das misturas interesterificadas por “Lipozyme RM IM” (A) e “Lipozyme TL IM” (C), a diferentes pressões, após cada utilização de 3h e respectivas percentagens de redução de SFC_{35 °C} (B) e (D).49

Figura 14. Valores de SFC_{35 °C} das misturas interesterificadas por “Novozym 435” (A) e pela lipase/aciltransferase de *Candida parapsilosis* (C) a diferentes pressões, após cada utilização de 3h e respectivas percentagens de redução de SFC_{35 °C} (B) e (D).50

Figura 15. Actividade relativa de “Lipozyme RM IM”, “Lipozyme TL IM”, “Novozym 435” e da lipase/aciltransferase de *Candida parapsilosis* nos ensaios a 60 °C à pressão atmosférica, sem agitação, e nos ensaios a altas pressões (25, 50 e 100 MPa), (A) (B) (C) e (D) respectivamente.51

Figura 16. Evolução dos teores de ácidos gordos livres presentes nas misturas reaccionais, submetidas a reacções de interesterificação a 0,1 MPa e a altas pressões (25, 50 e 100 MPa), ao longo dos 6 “batches”, pelas enzimas “Lipozyme RM IMTM” (A), “Lipozyme TL IMTM” (B), “Novozym 435TM” e pela lipase/aciltransferase de *Candida parapsilosis* (C).52

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Poupança a nível ambiental, por unidade de produção (1000 kg produto processado), ao optar pela interesterificação por via enzimática em detrimento da interesterificação química (Cowan, 2008).....	22
Quadro 2. Teores de produtos primários e secundários de oxidação formados durante os ensaios de interesterificação à pressão atmosférica, catalisados por “Novozym 435™”, em reactor, com e sem agitação, e à temperatura de 60 °C.....	54
Quadro 3. Teores de produtos primários e secundários de oxidação, formados durante os ensaios de interesterificação à pressão atmosférica, catalisados por Lipozyme TLIM, Lipozyme RM IM, Novozym 435 e pela lipase/aciltransferase de <i>Candida parapsilosis</i> , em reactor de altas pressões, à temperatura de 60 °C.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AGL – Ácidos gordos livres

a_w – Actividade da água

DAG – “Diacylglycerols” – diacilgliceróis

DHA - Ácido docosa-hexenóico, C22:6

EPA - Ácido eicosa-pentenóico, C20:5

EPAX 4510 TG - Concentrado de TAG enriquecido em omega-3 PUFA (45% de EPA, e 10% de DHA)

FFA - “Free Fatty Acids”- ácidos gordos livres

HDL – “High Density Lipoproteins” – lipoproteínas de alta densidade

LCFA – “Long chain fatty acids” – ácidos gordos de cadeia longa

LDL – “Low Density Lipoproteins”- lipoproteínas de baixa densidade

NMR – “Nuclear Magnetic Resonance”- ressonância magnética nuclear

MAG – “Monoacylglycerols” – monoacilgliceróis

MUFA – “Monounsaturated fatty acid” – ácidos gordos monoinsaturados

MCFA – “Medium chain fatty acids” – ácidos gordos de cadeia média

n-3 PUFA - “Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids”- ácidos gordos polinsaturados ómega-3

PUFA – “Polyunsaturated Fatty Acids” – ácidos gordos polinsaturados

SCFA – “Short-Chain Fatty acids” – ácidos gordos de cadeia curta

SFC- “Solid Fat Content” – Teor de gordura sólida medido por NMR

SFC_{35 °C} – Teor de gordura sólida medido por NMR a 35 °C

SFC_{30 °C} – Teor de gordura sólida medido por NMR a 30 °C

SFC_{20 °C} – Teor de gordura sólida medido por NMR a 20 °C

SFC_{10 °C} – Teor de gordura sólida medido por NMR a 10 °C

SFI – “Solid Fat Index” - índice de gordura sólida

TAG – “Triacylglycerols” - triacilgliceróis

1. ENQUADRAMENTO DO TEMA: OS LÍPIDOS ESTRUTURADOS

Nos países desenvolvidos, as sociedades humanas tornaram-se menos rurais e mais urbanas, e a actividade económica passou a ser menos centrada na agricultura e mais industrializada. Essas mudanças trouxeram melhorias em muitos aspectos da qualidade de vida, entre os quais se salienta uma dieta mais variada e segura, associadas a uma longevidade crescente. Tornou-se mais difícil equilibrar a ingestão e o gasto de energia, o que resultou no aumento da obesidade em todo o mundo e na prevalência de doenças crónicas não transmissíveis, por exemplo, hipertensão, doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2.

É sabido que a dieta contribui para a saúde. Uma avaliação dos benefícios e dos efeitos adversos dos nutrientes e de outros componentes na dieta levou à descoberta de que é possível criar alimentos com características específicas capazes de influenciar o funcionamento do corpo em níveis que vão além das necessidades nutricionais básicas. Esses alimentos passaram a ser conhecidos como “funcionais”.

A primeira exploração sistemática dos aspectos positivos da funcionalidade dos alimentos foi realizada no Japão. Na 2ª metade da década de 90, a FUFOS (‘Functional Food Science in Europe’) criou uma definição de alimento funcional como sendo aquele alimento para o qual foi “satisfatoriamente demonstrado ser capaz de afectar benéficamente uma ou mais funções alvo no organismo, além de seus efeitos nutricionais adequados, de modo que tenha relevância na melhoria do estado de saúde e bem estar e/ ou diminuição do risco de doença”. Neste contexto “função alvo” é uma actividade biológica em curso no organismo humano e que é o alvo para intervenção, tendo em vista a manutenção ou melhoria da saúde e do bem estar e/ou diminuição do risco de doença. O alimento funcional não é uma pílula, cápsula ou qualquer forma de suplemento nutricional, mas sim um alimento consumido como parte do padrão normal de alimentação (Howlett, 2008).

Apesar de a maioria das substâncias naturais com efeitos benéficos para a saúde ser de origem vegetal, também existem alguns componentes fisiologicamente activos em produtos de origem animal. Um exemplo disso são os ácidos gordos ómega-3 ($n-3$), uma classe essencial de ácidos gordos polinsaturados (“polyunsaturated fatty acids”, PUFA) presentes no óleo de peixes gordos (e.g. salmão, atum, cavala, sardinha e arenque). Nesta classe de ácidos gordos encontram-se o ácido eicosapentenoico (EPA; 20:5) e o ácido docosahexenoico (DHA; 22:6) (Hasler, 1998). Estas substâncias promovem a melhoria na integridade endotelial e arterial, além de combaterem a coagulação sanguínea e reduzirem a

pressão arterial. Também diminuem os níveis plasmáticos de triacilgliceróis (TAGs) e exercem efeitos supressivos no sistema imunitário (Howlett, 2008).

Quando os ácidos gordos *n*-3 substituem os ácidos gordos saturados na dieta, a concentração de colesterol total e de triglicéridos baixa (Phillipson *et al.*, 1985).

Existe um vasto número de artigos que demonstram como o seu consumo tem efeitos benéficos, especialmente a nível cardiovascular, reduzindo significativamente a mortalidade por doenças coronárias, o número de enfartes do miocárdio e acidentes vasculares cerebrais (Wang *et al.*, 2006). As populações com elevado consumo de peixe, como os Esquimós e os Japoneses, têm baixas taxas de enfartes do miocárdio (Weber, 1989). Estudos epidemiológicos mostraram um decréscimo na mortalidade por doença cardíaca nas pessoas que consomem quantidades relativamente pequenas de peixe (0,5 g ácidos gordos *n*-3/dia ou 1,5 g de óleo de peixe/dia) durante um longo período de tempo (Kromhout *et al.*, 1985). Estes estudos sugerem que pequenas doses durante longos períodos de tempo têm efeitos benéficos, possivelmente por reduzirem a pressão arterial e outros factores de risco.

Os *n*-3 PUFA são também agentes anti-inflamatórios potenciais. Como tal, podem ter efeito terapêutico em doenças inflamatórias agudas e crónicas. Há fortes evidências clínicas da sua eficácia, por exemplo, na artrite reumatóide (Calder, 2006).

Pensa-se que os efeitos mais promissores destas substâncias no futuro, serão a nível do desenvolvimento neurológico (incluindo a função cognitiva) e da saúde mental. Os EPA e DHA são importantes componentes do cérebro e dos tecidos nervosos e desempenham uma função essencial no desenvolvimento destes órgãos, em particular durante o último trimestre de gravidez e durante a infância (Pike e Jackson, 2010).

Neste contexto, têm sido realizados estudos para a produção de novos lípidos com propriedades funcionais, i.e., lípidos estruturados ("*structured lipids*", S.L.). Os S.L. são misturas de TAGs, modificados química ou enzimaticamente, através da incorporação de novos ácidos gordos e/ou alteração na sua distribuição posicional nas moléculas de glicerol (*n*-1, 3 ou 2) (Lee e Akoh, 1998). Dito de outra forma, os S.L. são misturas de TAGs com uma estrutura molecular definida (i. e., ácidos gordos específicos em posições específicas). A estrutura molecular dos TAGs influencia o seu destino metabólico no organismo (i.e. digestão e absorção) tal como as suas características físicas (e.g. ponto de fusão, polimorfismo, teor de gordura sólida) e características químicas (e.g. estabilidade oxidativa).

Criar TAGs com uma estrutura química particular permite controlar o comportamento dos mesmos, melhorando as suas propriedades nutricionais e farmacêuticas. Os S.L. podem ser produzidos, dependendo do tipo de substrato disponível, por um dos seguintes métodos: alcoólise, acidólise ou interesterificação (Lee e Akoh, 1998).

Na indústria de margarinas, as gorduras plásticas utilizadas podem ser produzidas por hidrogenação, fraccionamento ou interesterificação. O processo de hidrogenação leva à conversão dos ácidos gordos polinsaturados em saturados, com consequente perda de ácidos gordos essenciais, para além de originar a formação de gorduras *trans*, que causam problemas de saúde. Actualmente, a hidrogenação está a ser abandonada em favor da interesterificação, que consiste na troca de grupos acilo entre moléculas de TAG, com modificação das propriedades reológicas das gorduras, sem alterar a sua composição em ácidos gordos. O fraccionamento é limitado pelas fontes de gordura e a variedade de produtos. A interesterificação compreende a interesterificação química e a interesterificação catalisada por lipases (Xu, 2000).

Recentemente, os investigadores têm apostado na interesterificação catalisada por lipases devido às vantagens inerentes ao processo:

- A interesterificação catalisada por lipases é mais específica, especialmente quando são utilizadas lipases 1,3-específicas,
- Permite produzir “tailor made fats”, que possuem propriedades físicas ou nutricionais desejáveis,
- Disponibilidade de diversas fontes de lipases (Xu, 2000),
- O processo é natural e ecológico, uma vez que ocorre em condições mais suaves de temperatura e pressão, reduzindo o custo energético e melhorando a aceitação por parte dos consumidores (Nascimento *et al.*, 2004),
- Eliminação de reacções secundárias indesejáveis e consequente aumento do rendimento e da pureza do produto.

1.1 OBJECTIVOS

O presente trabalho surge na sequência de estudos anteriores sobre o efeito das altas pressões: (i) na cinética da produção de lípidos estruturados enriquecidos em *n*-3 PUFA, em meio livre de solvente, por interesterificação enzimática, e (ii) nas características físicas dos S.L. obtidos (Osório *et. al*, 2008; Lopes, 2009).

Os quatro biocatalisadores utilizados foram as preparações comerciais das lipases termoestáveis imobilizadas de *Rhizomucor miehei* (“LipozymeTM RMIM”), *Thermomyces lanuginosa* (“LipozymeTM TLIM”) de *Candida antarctica* (“NovozymeTM 435”), e a lipase/aciltransferase de *Candida parapsilosis*, como alternativa às lipases comerciais.

A “LipozymeTM RMIM” e a “LipozymeTM TLIM” apresentam selectividade 1,3, ou seja incorporam os *n*-3 PUFA nestas posições específicas, mantendo os ácidos gordos na posição *n*-2 (Xu, 2000). A lipase “NovozymTM 435” apresenta uma especificidade que depende dos substratos onde actua. Em algumas reacções esta enzima funciona como uma lipase não específica, enquanto noutras reacções revela uma especificidade posicional *n*-1,3 (Novo Nordisk Biochem, 1999).

O meio reaccional era constituído por uma mistura de estearina de palma (“palm stearin”, PS), óleo de palmiste (“palm kernel”, PK) e um concentrado de triacilgliceróis enriquecido em ácidos gordos *n*-3 PUFA (EPAX 4510 TG, EPAX AS, Norway). As reacções decorreram a 60 °C, e a pressões de 0,1 (pressão atmosférica), 25, 50 e 100 MPa.

Avaliou-se também a estabilidade operacional dos 4 biocatalisadores testados, em ensaios sucessivos de reutilização às diferentes pressões, e por períodos de 3 horas cada.

Em todos os ensaios foram monitorizadas as modificações nas características reológicas da mistura através da determinação do teor de gordura sólida a 35 °C, por espectrofotometria de ressonância magnética nuclear (“nuclear magnetic resonance”, NMR). Foram também efectuadas determinações de ácidos gordos livres e dos produtos de oxidação primários e secundários formados durante a reacção, para avaliar respectivamente a extensão das reacções degradativas de hidrólise e oxidação.

2 ENQUADRAMENTO TEÓRICO

2.1 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS GORDURAS

Os lípidos são nutrientes essenciais na dieta humana: são fontes concentradas de energia (9 kcal/g); os ácidos gordos essenciais são precursores das prostaglandinas (hormonas necessárias à regulação de várias funções vitais); são veículos de transporte para as vitaminas lipossolúveis (vitaminas A, D, E e K) e são necessários para o desenvolvimento e crescimento do corpo humano.

As gorduras desempenham ainda um importante papel a nível das propriedades funcionais e sensoriais nos produtos alimentares (McGrady, 1993). Melhoram sensorialmente os alimentos que consumimos, a nível da textura, “flavour”, palatabilidade e contribuem para a sensação de saciedade.

2.1.1 PROPRIEDADES QUÍMICAS DAS GORDURAS

Mais de 95% dos óleos e gorduras são constituídos por TAGs. Os TAGs são ésteres formados por uma molécula de glicerol e três ácidos gordos. São insolúveis em água e à temperatura ambiente, podem existir no estado líquido (óleos) ou no estado sólido (gorduras) (Giese, 1996).

O tipo e a localização dos ácidos gordos na molécula de glicerol definem as características físicas e químicas das gorduras (McGrady, 1993), o destino metabólico e os benefícios para a saúde (Osborn e Akoh, 2002).

Consequentemente, uma análise cuidadosa da função e metabolismo dos ácidos gordos é de extrema relevância.

2.1.1.1 CLASSIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GORDOS RELATIVAMENTE AO COMPRIMENTO DA CADEIA

Ácidos gordos de cadeia curta

Os ácidos gordos de cadeia curta (“short-chain fatty acids”, SCFA) têm uma cadeia com 2 a 6 carbonos e são conhecidos pela sua volatilidade. As fontes principais de SCFA são o leite de vaca e a manteiga. Devido à sua solubilidade na água, pequeno tamanho molecular e curto comprimento da cadeia, são os ácidos gordos mais rapidamente absorvidos no

estômago. Os SCFA ligados à posição *n*-3 do TAG vão ser completamente hidrolisados no lúmen do estômago e no intestino delgado, devido à especificidade posicional e de comprimento de cadeia da lipase pancreática humana (Osborn e Akoh, 2002).

Os SCFA têm baixo valor calórico: C2:0, 3,5 kcal/g; C3:0, 5,0 kcal/g; C4:0, 6,0 kcal/g e C6:0, 7,5 kcal/g (Akoh, 1998).

Ácidos gordos de cadeia média

As fontes principais de ácidos gordos de cadeia média (“medium-chain fatty acids”, MCFA, C6:0 a C12:0) são o óleo de coco e o óleo de palmiste. Os MCFA são transportados preferencialmente pela veia porta para o fígado (Bell *et al*, 1991).

Os MCFA são rapidamente metabolizados e têm fraca tendência a depositarem-se sob a forma de gordura, porque não são rapidamente re-esterificados em TAGs. Embora estes ácidos gordos possam ser úteis no controlo da obesidade, podem aumentar potencialmente os níveis de colesterol total (Osborn e Akoh, 2002).

Os MCFA são frequentemente utilizados em S.L. conjuntamente com PUFA, aliando a sua inerente mobilidade, solubilidade e facilidade de metabolização, com os efeitos benéficos para a saúde dos PUFA (Akoh, 1998).

Ácidos Gordos de Cadeia Longa

Os ácidos gordos de cadeia longa (“long-chain fatty acids”, LCFA, C14:0 a C24) estão presentes em gorduras animais, vegetais e óleos de peixes.

Estes ácidos gordos são absorvidos e metabolizados mais lentamente que os SCFA e os MCFA. OS LCFA não podem ser absorvidos ou transportados no sangue, devido ao seu comportamento hidrofóbico. Primeiro, os LCFA são empacotados em micelas, e depois entram nas células intestinais, onde são formados os quilomicrons. Os quilomicrons são secretados para o sistema linfático, e entram na circulação sistémica. É necessária carnitina para transportar os LCFA para a mitocôndria das células.

Existem diversos tipos de LCFA e alguns deles têm um papel mais relevante na produção de lípidos estruturados.

Os ácidos gordos essenciais (“essential fatty acids”, EFA) não podem ser sintetizados pelo organismo humano, mas são absolutamente necessários para a saúde, pelo que devem ser incluídos na dieta (Guilliams, 2000) .

O ácido linoleico (18:2 *n*-6), que se encontra na maioria dos óleos vegetais e sementes de plantas, é um EFA que pela acção das enzimas elongase e dessaturase, dá origem ao ácido araquidónico (20:4 *n*-6), que por sua vez é o precursor da formação de eicosanóides (Osborn e Akoh, 2002).

Outro EFA é o ácido linolénico (18:3 *n*-3), que se encontra no óleo de soja e linhaça. O EPA e o DHA, presentes em óleos de peixe, são PUFA de grande interesse para a produção de S.L.. Como já foi referido anteriormente (c.f. 1.1), os ácidos gordos *n*-3 têm efeitos benéficos em doentes com arteriosclerose, doenças cardiovasculares, doenças inflamatórias e um papel fundamental no crescimento e desenvolvimento humano. O DHA é um componente vital dos fosfolípidos das membranas celulares, especialmente em órgãos como a retina e o cérebro, e como tal este ácido gordo é essencial ao seu bom funcionamento (Connor, 2000).

Os ácidos gordos *n*-9, na forma de ácido oleico (18:1 *n*-9) estão presentes em muitos óleos vegetais, não são EFAs, mas reduzem moderadamente os níveis de colesterol.

2.1.1.2 CLASSIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GORDOS RELATIVAMENTE AO GRAU DE INSATURAÇÃO

Os ácidos gordos são classificados de acordo com o seu grau de saturação. Ácidos gordos saturados são aqueles que contêm ligações simples carbono-carbono, e são menos reactivos. Encontram-se em grandes quantidades na manteiga, óleo de coco e óleo de palma (Guilliams, 2000).

Os ácidos gordos insaturados são aqueles que contêm uma ou mais ligações duplas carbono-carbono. Quando o ácido gordo contém uma ligação dupla carbono-carbono é designado monoinsaturado (“monounsaturated fatty acids”, MUFA). O ácido gordo monoinsaturado mais comum é o ácido oleico presente no azeite, óleo de canola, óleo de amendoim e óleo de girassol (Guilliams, 2000). Se um ácido gordo contiver mais do que uma ligação dupla, é designado polinsaturado (PUFA).

Devido à presença de ligações duplas, os ácidos gordos insaturados são mais reactivos. Esta reactividade aumenta com o número de duplas ligações.

Dos PUFA, destacam-se pelo seu maior interesse o linoleico, o linolénico, o araquidónico, o EPA e o DHA, que contém respectivamente 2, 3, 4, 5 e 6 ligações duplas.

2.1.2 PROPRIEDADES FÍSICAS DAS GORDURAS

As propriedades físicas das gorduras têm sido objecto de investigação no mundo académico e na indústria. A indústria de óleos e gorduras alimentares está envolvida no estudo de misturas complexas de TAGs, com o objectivo de modificar as suas propriedades para servir aplicações específicas nos produtos alimentares e para controlar a sua estabilidade e prazo de validade (Birker e Padley, 1987).

Um requisito essencial para poder controlar de forma eficaz o processo de produção e as características do produto, é a compreensão das propriedades físicas dos óleos e gorduras. Estas propriedades estão dependentes do grau de insaturação, do comprimento da cadeia carbonada, das formas isoméricas dos ácidos gordos, da configuração molecular e do tipo de processamento industrial.

Em geral, as gorduras que são líquidas à temperatura ambiente tendem a ser mais insaturadas do que as que se apresentam no estado sólido, mas há excepções (Giese, 1996).

O ponto de fusão de uma gordura está relacionada com o comprimento da cadeia dos seus ácidos gordos constituintes. À medida que aumenta o comprimento da cadeia carbonada de um ácido gordo saturado, o seu ponto de fusão também aumenta. Esta é a razão pela qual o óleo de coco (90% ácidos gordos saturados) com uma alta proporção de SCFA, se apresenta no estado líquido, ao passo que a banha (37% ácidos gordos saturados) com uma alta proporção de LCFA é semi-sólida a 25°C.

Os ácidos gordos insaturados podem existir na forma *cis* ou na forma *trans*, dependendo da configuração dos átomos de hidrogénio ligados aos átomos de carbono juntos na ligação dupla. Quando os dois átomos de hidrogénio estão em lados opostos da ligação dupla, a configuração é designada *trans*; quando os dois átomos de hidrogénio estão no mesmo lado da ligação dupla, a configuração é designada *cis*. Os ácidos gordos *trans* presentes na dieta

são provenientes de gorduras parcialmente hidrogenadas, de óleos refinados, da carne, do leite e dos derivados de animais ruminantes. Os alimentos contendo gordura parcialmente hidrogenada contribuem com cerca de 80% a 90% da ingestão diária ácidos gordos *trans*. Para alimentos provenientes de animais ruminantes esta contribuição é bem menor, sendo estimada em torno de 2% a 8% (Larque *et al.*, 2001).

O ponto de fusão dos ácidos gordos insaturados é profundamente afectada pela posição e conformação da ligação dupla. Durante a hidrogenação, podem ocorrer alterações na posição da ligação dupla, assim como alterações na isomerização *cis-trans* [1]. A conversão dos isómeros *cis*, em isómeros *trans*, resulta num aumento do ponto de fusão.

Polimorfismo das gorduras

Uma das características da cristalização dos TAGs é o polimorfismo, ou seja, a ocorrência de uma grande variedade de formas cristalinas diferentes, dependendo da forma como as moléculas se orientam no estado sólido (Birker e Padley, 1987). O polimorfismo é usado deliberadamente no fabrico de gorduras, de modo a controlar a forma, tamanho e interacção dos cristais nos produtos.

As formas cristalinas primárias dos TAGs são designadas por: α , β e β' (Figura 1), que correspondem às três principais disposições transversais das cadeias de ácidos gordos (Bailey e Ollis, 1986).

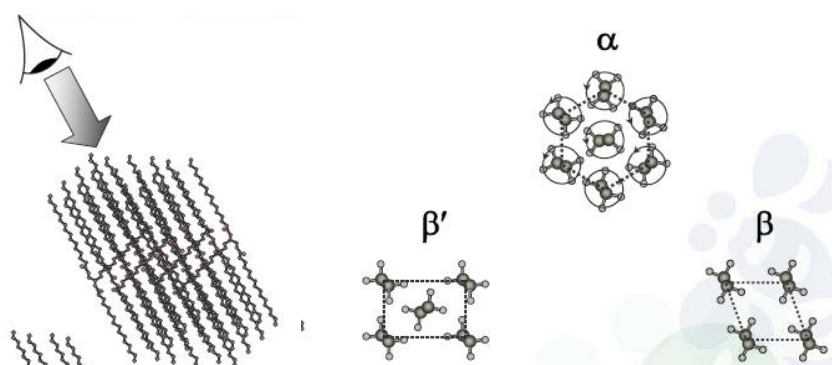


Figura 1. Polimorfismo dos triacilgliceróis: forma α (cristais do sistema hexagonal), forma β (cristais do sistema triclínico) e forma β' (cristais do sistema ortorrômbico) (Fonte: Smith, 2008).

A forma polimórfica α (cristais do sistema hexagonal) é a mais instável, com menor densidade e menor ponto de fusão. É formada na fase inicial do processo de cristalização da gordura devido ao arrefecimento rápido. Os cristais α , devido à sua falta de estabilidade,

são transformados em segundos ou minutos na forma β ou β' (Bailey e Ollis, 1986; Chryson, 1985).

A forma β' (cristais do sistema ortorrômbico) é constituída por uma rede com uma grande área superficial, capaz de imobilizar uma grande quantidade de óleo e de fase aquosa. Trata-se da forma estável sólida de certos tipos de TAGs, como aqueles do tipo $C_n C_{n+2}$, e também da maioria das misturas complexas naturais. Os cristais são relativamente pequenos, finos, suaves e conferem ao produto uma superfície brilhante (Gunstone, 1998).

Os “shortenings” e as margarinas possuem uma textura suave e cremosa, devido à inclusão de cristais β' [1].

A forma β (cristais do sistema triclinico) é uma das mais estáveis para a maioria dos TAGs puros e apresenta o ponto de fusão mais elevado. Algumas gorduras, de composição simples (exemplo: manteiga de cacau), podem também cristalizar nesta forma, dependendo das condições experimentais. Apesar de os cristais β serem inicialmente pequenos, crescem em aglomerados em forma de agulhas, que são menos capazes de incorporar líquido e produzem a característica textura granulosa (Gunstone, 1998).

Os óleos com TAGs com ácidos gordos com diferentes comprimentos de cadeia (usualmente C_{16} e C_{18}) têm maior probabilidade de cristalizar na forma β' , enquanto que aqueles constituídos quase inteiramente por ácidos C_{18} , têm tendência para a forma β (Gunstone, 1998).

A maioria das gorduras apresenta polimorfismo monotrópico, isto é, quando ocorre uma transição (por exemplo, de β' para β), o empacotamento das cadeias moleculares do triacilglicerol torna-se mais compacto, o que resulta num aumento do ponto de fusão (Marangoni, 1999; Rousseau *et al.*, 1996). A taxa e a extensão da transformação são controladas pela composição molecular e configuração da gordura, condições de cristalização e duração e temperatura do armazenamento.

No fabrico de margarinas, a agitação mecânica e térmica durante o processamento e o armazenamento a temperaturas elevadas tende a acelerar a taxa de transformação dos cristais. Em geral, as gorduras que contêm diferentes tipos de moléculas tendem a permanecer em formas cristalinas de baixo ponto de fusão. As gorduras que contêm um limitado tipo de moléculas transformam-se rapidamente em formas cristalinas com ponto de fusão mais elevado [1].

O processo de cristalização é dividido em duas fases: nucleação e crescimento dos cristais. A nucleação envolve a formação de agregados de moléculas que excederam um tamanho crítico e são, portanto, estáveis. O processo de nucleação é induzido pelo rápido arrefecimento da gordura inicialmente no estado líquido (Herrera *et al.*, 1998; Timms, 1995).

As propriedades reológicas macroscópicas das redes cristalinas lipídicas destes produtos são extremamente importantes. Muitos dos atributos sensoriais, como a espalhabilidade, a sensação na boca e a textura estão dependentes da resistência mecânica da rede cristalina (Piska *et al.*, 2006).

A investigação na área de cristalização de gorduras utiliza metodologias de: calorimetria diferencial de varrimento (“differential scanning calorimeter”, DSC), difracção por raios X, RMN e diferentes técnicas de microscopia (Marangoni, 2005).

Teor de gordura sólida

O teor de gordura sólida (“solid fat content”, SFC) é um parâmetro que expressa o rácio gordura sólida/gordura líquida de uma gordura a várias temperaturas (Marangoni e Rousseau, 1995). Produtos com alto teor lipídico, como a manteiga, as margarinas, os cremes vegetais e similares, devem apresentar uma proporção adequada entre as fracções sólida e líquida para que o produto tenha a textura e a funcionalidade (isto é, espalhabilidade) desejada pelos consumidores (Toro-Vasquez *et al.*, 2000).

As determinações do teor de gordura sólida a diferentes temperaturas até à fusão da amostra, pode ser representada em gráficos, através de uma curva que ilustra as alterações (O'Brien, 2004).

As alterações causadas pela interesterificação dos TAGs reflectem-se nos valores de SFC, a diferentes temperaturas (Marangoni e Rousseau, 1995).

Os métodos mais utilizados para determinar o teor de gordura sólida são: SFC por NMR e o Índice de gordura sólida (“solid fat index”, SFI) por dilatométrie (Timms, 1985).

Os resultados da determinação por NMR, em termos de SFC, são semelhantes mas não comparáveis directamente com os resultados em termos de SFI; no entanto os dois métodos podem ser correlacionados (Chrysam, 1985).

Até à década de 70 do século XX, a dilatométrie era o método mais comum. Esta técnica é um método indirecto de avaliação do teor de gordura sólida. Baseia-se na dilatação, ou seja,

na alteração de volume que resulta da fusão total da gordura a determinada temperatura (Timms, 1985). Quando a gordura sólida derrete, o volume da amostra aumenta e esta alteração pode ser medida por dilatometria (Shaidi e Wanasundara, 2002). Apesar da sua importância, o método SFI é lento e laborioso.

Em busca de um método de análise mais rápido, barato e automatizado, em 1974, os cientistas da Unilever foram os pioneiros no uso da técnica de NMR de impulsos para a determinação do rácio sólido/líquido em gorduras (Van Putte e Van den Enden, 1974).

O rácio sólido/líquido obtido pela técnica de NMR é expresso em forma de percentagem, onde 0% corresponde a uma amostra totalmente líquida e 100% a uma amostra totalmente sólida (Timms, 2003).

Nos dias de hoje, a determinação de SFC por NMR de baixa resolução é o método padrão internacionalmente aceite e de grande importância na indústria de óleos e gorduras (ISO 8292:1991). É uma técnica não destrutiva que possibilita resultados directos e rápidos (Martini *et al*, 2005; Goh e Ker, 1991).

A técnica de NMR é uma técnica espectrofotométrica com uma variedade de aplicações em análises de estrutura e de composição. É baseada no princípio que os núcleos do átomo de hidrogénio se alinham num campo magnético. Estes núcleos alinhados podem ser excitados ao aplicar um segundo campo magnético na forma de uma onda de rádio, retornando à sua posição de equilíbrio posteriormente, num processo de relaxamento.

A eficiência destes processos de relaxamento é determinado pela mobilidade das moléculas às quais pertencem os núcleos. Este é o princípio básico da determinação do SFC por NMR, que resulta da grande diferença na duração do relaxamento das fases líquidas e das fases sólidas, uma vez que o sinal de uma fase sólida desvanece-se mais rapidamente do que o de uma fase líquida (Van Duynhoven *et al*, 1999).

O método mede dois impulsos distintos: um sinal que é emitido imediatamente a seguir ao impulso, e que é proporcional ao total de gordura (sólida e líquida) e outro, cerca de 70 μ s depois, proporcional à quantidade de gordura líquida (Van Putte *et al*, 1975).

O SFC é o indicador de muitas características das margarinas, incluindo a sua aparência, espalhabilidade, exsudação de óleo e propriedades organolépticas (Ribeiro *et al.*, 2009). Por exemplo, o SFC_{5 °C} e o SFC_{10 °C} de uma margarina determinam a sua facilidade em espalhar à temperatura de refrigeração; o SFC_{25 °C} está relacionado com a estabilidade do produto e

resistência à exsudação de óleo à temperatura ambiente; o $SFC_{35\text{ }^{\circ}\text{C}}$ está relacionado com a textura e propriedades de libertação de aroma e *flavour* na boca (Dian *et al*, 2007; Lida e Ali, 1998).

O $SFC_{10\text{ }^{\circ}\text{C}}$ não deve ser superior a 32%, de forma a que a espalhabilidade esteja garantida à temperatura de refrigeração (Lida e Ali, 1998). Para evitar que as margarinas produzam uma sensação gordurosa na boca, as margarinas devem apresentar obrigatoriamente SFC inferiores a 3,5% a 33,3° C, de forma a derreterem completamente à temperatura corporal (Karabulut *et al.*, 2004).

As curvas de SFC antes e depois da interesterificação mostram mudanças consideráveis no comportamento das gorduras, fornecendo informações sobre: (i) a plasticidade e (ii) o ponto de fusão, que pode ser obtido da curva do SFC de forma gráfica ou matemática. O ponto de fusão é definido como a temperatura à qual a gordura apresenta 4% de sólidos (Karabulut *et al.*, 2004; Koh *et al.* 1999).

A grande maioria dos estudos de interesterificação publicados usa a curva de SFC como ferramenta para delinear aplicações específicas das gorduras interesterificadas nos alimentos e otimizar o processo (Karabulut *et al.*, 2004; Kok *et al.*, 1999; List *et al.*, 1977; Silva e Gioielli, 2006; Petrauskaite *et al.*, 1998; Khatoon, 2000; Lida e Ali, 1998; Gioielli e Baruffaldi, 1988; Marangoni e Rousseau, 1998).

2.2 TÉCNICAS DE MODIFICAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS GORDURAS

Na natureza existem em abundância óleos vegetais e gorduras. No entanto, para atender às diversas aplicações comerciais, os óleos e as gorduras devem respeitar exigências específicas para cada produto, nomeadamente a nível funcional e estrutural. Por exemplo, para alguns bolos de pastelaria é necessário um determinado rácio de gordura sólida/líquida, de forma a que o óleo seja facilmente distribuído por toda a massa, cubra as partículas de farinha e auxilie no arejamento da massa. Ao mesmo tempo, pretende-se evitar um produto final demasiado gorduroso. Já nas margarinas, é necessário um determinado SFC, para conferir estrutura à gordura, sem comprometer a sua espalhabilidade.

Para suprir essas necessidades do mercado e para fornecer produtos uniformes a partir de matérias primas, nem sempre uniformes, surgiram as técnicas de modificação de óleos e gorduras. Estas técnicas permitem uma maior flexibilidade de escolha das matérias primas e trazem também vantagens aos consumidores, pois permitem o fabrico de produtos de qualidade constante a preços razoáveis (Coenen, 1974; Hoffmann, 1989c; Gioielli, 1986).

Actualmente, esses métodos estão tão firmemente estabelecidos e são aplicados numa escala tão grande que seria praticamente impossível atender aos padrões de mercado sem o uso de técnicas de modificação.

2.2.1 HIDROGENAÇÃO

Em 1987, Sabatier e Senderens (França) descobriram a hidrogenação catalítica. Normand aplicou mais tarde o processo às gorduras insaturadas. A hidrogenação é o processo pelo qual o hidrogénio é adicionado às duplas ligações dos ácidos gordos (Figura 2), e foi desenvolvida para responder à necessidade de:

- converter óleos no estado líquido na sua forma semi-sólida para melhorar a sua performance em certos alimentos;
- melhorar a estabilidade térmica e oxidativa do óleo ou gordura.

É um processo de grande importância, porque confere a desejada estabilidade e funcionalidade a certos produtos. A hidrogenação parcial tornou-se um processo muito usado para modificar óleos de sementes e óleos de peixe.

Em 1990, um terço dos óleos alimentares eram hidrogenados, e apenas um décimo eram fraccionados ou interesterificados (Gunstone, 1998). Esta proporção tem vindo a mudar, devido às preocupações inerentes ao consumo de ácidos gordos *trans* formados durante a hidrogenação parcial.

No processo de hidrogenação, o hidrogénio em forma de gás reage com a gordura, a temperatura e pressão elevadas e na presença de um catalisador. O catalisador mais utilizado é o níquel, que é removido da gordura, após o processo de hidrogenação ter terminado. À medida que o processo decorre, há um aumento gradual no ponto de fusão da gordura. O processo pode ser interrompido em qualquer momento [1].

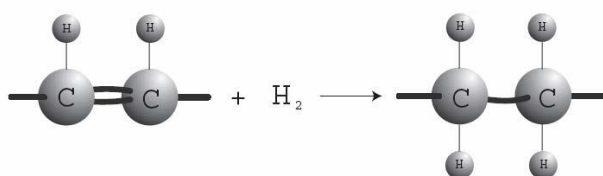


Figura 2. Hidrogenação: o hidrogénio gasoso reage com as duplas ligações dos ácidos gordos insaturados [1].

As seguintes mudanças têm lugar, quando o óleo é parcialmente hidrogenado:

- Há uma mudança no ponto de fusão do óleo, como consequência do aumento na proporção de ácidos gordos saturados e/ou *trans*, o que afecta a espalhabilidade, as características sensoriais, e a eficiência da panificação,
- Há uma melhoria na estabilidade relativamente à oxidação atmosférica,
- Ocorre uma redução no valor nutricional do produto, relacionado com a redução nos níveis de ácidos gordos essenciais (ácidos α -linolénico e linoleico) e a presença de ácidos gordos *trans* (Gunstone, 1998).

As condições da hidrogenação podem ser alteradas pelo fabricante para que o produto tenha as propriedades físico-químicas desejadas. Factores importantes são: o catalisador (diâmetro do poro, comprimento do poro, nível de actividade e quantidade), temperatura da reacção, a pressão de hidrogénio, o tempo e a intensidade de agitação. A hidrogenação é favorecida por uma alta concentração de hidrogénio (aumento na pressão, aumento na agitação) ao passo que a isomerização é favorecida por factores que levam a uma maior necessidade de hidrogénio, que não pode ser completamente satisfeita (aumento na temperatura, maior quantidade de catalisador, um catalisador mais activo, um óleo mais insaturado) (Gunstone, 1998).

2.2.2 FRACCIONAMENTO

Foram desenvolvidos diferentes métodos para o fraccionamento de gorduras, principalmente com o objectivo de modificar a sua textura e ponto de fusão.

O fraccionamento permite a separação de classes de TAG, mas não muda a distribuição posicional dos ácidos gordos (Willis *et al.*, 1998). Esta técnica consiste na separação de óleos e gorduras em dois ou mais componentes, dependendo da sua solubilidade (em líquidos, óleos ou solventes) e ponto de fusão, por arrefecimento controlado. As fracções menos solúveis e com ponto de fusão mais elevado são designadas estearinas e as fracções mais solúveis, e com ponto de fusão mais baixo são as oleínas. Estes dois produtos alargam as possibilidades de utilização da gordura ou do óleo original (Gunstone, 1998).

O fraccionamento das gorduras é levado a cabo principalmente por quatro razões:

- Remoção dos componentes minoritários, que impedem a aplicação do óleo;
- Enriquecimento do óleo num TAG desejável;
- Separação de uma gordura em duas ou mais fracções, que permitem uma aplicação mais ampla e de maior valor comercial do que a gordura-mãe;
- Como uma alternativa à hidrogenação (Gunstone, 1998).

O fraccionamento pode ser repetido mais do que uma vez para dar origem a outras fracções, mas isto só é possível quando são obtidos produtos com alto valor comercial, como por exemplo os sucedâneos da manteiga de cacau. Na produção de sucedâneos da manteiga de cacau tem sido usada a técnica de fraccionamento em vários óleos, incluindo o óleo de palmiste, óleo de palma, óleo de soja hidrogenado e óleo de sementes de algodão (Kreulen, 1976).

As técnicas de fraccionamento mais utilizadas a nível industrial são:

a) Fraccionamento a seco: é o método mais comum que consiste numa cristalização lenta e controlada, na ausência de solvente. O objectivo é separar os TAGs pelo seu comportamento de cristalização (Deffense, 1993). O óleo no estado líquido é arrefecido lentamente para permitir a formação de cristais grandes e uniformes, que são depois separados por filtração. A formação e o crescimento dos cristais é afectada pela composição do óleo, taxa de arrefecimento e intersolubilidade TAG-TAG (Deffense, 1986). A separação das fases líquida e sólida é efectuada por centrifugação ou filtração (Kreulen, 1976).

b) Cristalização na presença de um solvente, como a acetona ou o hexano: reduz a tendência à formação de cristais mistos e permite uma separação mais eficiente dos diferentes TAGs, em comparação com o fraccionamento a seco (Sonnet *et al.*, 1986; Kreulen, 1976), mas é um processo mais dispendioso e a sua utilização é limitada.

c) Cristalização na presença de um agente molhante: é adicionada uma solução aquosa de um detergente após a cristalização. A estearina sólida, coberta pelo detergente, fica na fase aquosa, o que facilita a separação da oleína e da estearina. Este procedimento já não é muito utilizado actualmente (Gunstone, 1998).

2.2.3 INTERESTERIFICAÇÃO

A preocupação acerca dos efeitos nefastos para a saúde dos ácidos gordos *trans* fez despertar o interesse em formas alternativas de produção de gorduras com o ponto de fusão adequado. Este objectivo pode ser concretizado através do processo de interesterificação de gorduras, por via química ou via enzimática.

Com a reacção de interesterificação, altera-se o teor de gordura cristalizada de uma mistura de gorduras, através da troca de grupos acilo entre TAGs. Ao contrário da hidrogenação, a interesterificação não modifica a natureza dos ácidos gordos na gordura e por consequência não há formação de ácidos gordos *trans*, ocorrendo apenas um simples rearranjo molecular. Deste modo, o valor nutricional das gorduras interesterificadas mantém-se inalterado relativamente às gorduras originais (Haumann, 1994).

2.2.3.1 INTERESTERIFICAÇÃO QUÍMICA

A interesterificação química, conhecida desde 1844, é o método de interesterificação mais usado na indústria actualmente (Marangoni e Rousseau, 1995) e é levada a cabo sob a influência de um catalisador químico (e.g. metóxido de sódio).

Este tipo de interesterificação modifica a posição dos ácidos gordos dentro da molécula de triacilglicerol, aleatoriamente.

Uma das principais aplicações da interesterificação química é no melhoramento da banha (gordura de porco). A banha tende a formar cristais grosseiros, difíceis de controlar durante o armazenamento. Isto acontece porque 64% do ácido palmítico está ligado na posição *n*-2 da molécula de glicerol. Ao tornar aleatória a distribuição posicional dos ácidos gordos da

banha por interesterificação química, as propriedades físicas são melhoradas, e a banha “reorganizada” torna-se suave (DeMan, 1999).

Outra aplicação desta técnica é no fabrico de margarinas, “shortenings” e “spreads”, para melhorar a sua textura, modificar o seu ponto de fusão e aumentar a sua estabilidade (Nawar, 1996; Ghazali *et al.*, 1995). A interesterificação de óleo de soja e óleo de soja totalmente hidrogenado dá origem a matérias-primas para a margarina. A nível nutricional, a principal vantagem da interesterificação química é a produção de margarinas e outros produtos, sem recurso à hidrogenação, o que vai permitir um produto final livre de ácidos gordos *trans* (Willis *et al.*, 1998).

Os processos de interesterificação química, a nível industrial, decorrem a temperaturas da ordem dos 200 °C, mas a utilização dos catalisadores químicos permite que a temperatura da reacção seja reduzida 100 a 50 °C (Hustedt, 1976; Rozenaal, 1992; Soontag, 1979). A reacção demora entre 30 minutos a 2 horas. A concentração de catalisador varia de 0,1 a 0,6% (m/m). À medida que a concentração de catalisador aumenta, ocorre uma maior perda de lípidos neutros, devido à formação de sabões e ésteres metílicos (Kimoto *et al.*, 1994; Nawar, 1996; Rozenaal, 1992).

As matérias-primas utilizadas devem conter teores de água inferiores a 0,01%, teores de AGL inferiores a 0,05% e índice de peróxidos inferior a 1,0 de modo a não inactivar o catalisador químico utilizado (Kellens, 2000).

As principais desvantagens da interesterificação química são: o consumo energético elevado, a degradação dos PUFA, as reacções secundárias indesejadas, as dificuldades na remoção do catalisador após a reacção e a necessidade de purificação da gordura interesterificada (Erickson, 1995). Existem também algumas vantagens: este é um método simples, rápido, e que não requer equipamento muito dispendioso, apesar de requerer um número relativamente elevado de operações unitárias.

2.2.3.2 INTERESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

As lipases microbianas extracelulares (glicerol éster hidrolases, EC 3.1.1.3) são excretadas pelos microrganismos para promoverem a digestão dos materiais lipídicos. Catalisam a hidrólise de gorduras para dar origem a ácidos gordos livres (“free fatty acids”, FFA), MAGs, DAGs ou apenas FFAs e glicerol (Macrae, 1983). Sob condições experimentais adequadas, as lipases normalmente associadas à hidrólise de lípidos em meios aquosos, podem também catalisar reacções de esterificação (reacção inversa da hidrólise, que ocorre em sistemas microaquosos) e transesterificação.

Nos anos 80, ocorreu uma descoberta revolucionária: ao contrário do que se pensava, as lipases também funcionavam num ambiente com pouca água e eram estáveis nessas condições. Algumas das principais vantagens em utilizar lipases em meio orgânico em vez de as utilizar em meio aquoso, incluem:

- Mudança do equilíbrio termodinâmico a favor da síntese;
- Redução das reacções secundárias, dependentes da presença de água;
- Eliminação da contaminação microbiana;
- Adequado para reacções com substratos insolúveis ou instáveis em água.

Em condições em que a quantidade de água é reduzida, a hidrólise da gordura é minimizada para que a interesterificação catalisada por lipases seja a reacção dominante (Macrae, 1985; Jaeger *et al.*, 1994). Indústrias como a Unilever, a Fuji oil e a Novozymes dedicaram-se à investigação nessa área.

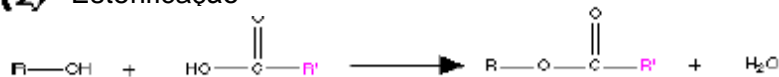
A transesterificação é subdividida em quatro subclasses, de acordo com as espécies químicas envolvidas. A alcoólise é a reacção entre um éster e um álcool. A acidólise é a reacção entre um éster e um ácido. A interesterificação é a reacção entre dois ésteres diferentes, para gerar novos ésteres. Na aminólise, o éster reage com uma amina, gerando uma amida e um álcool (Figura 3).

A versatilidade das lipases torna-as dos biocatalisadores mais usados na tecnologia enzimática e úteis em diversas reacções, encontrando aplicações em inúmeros processos industriais (nomeadamente na modificação de propriedades dos alimentos - indústria de óleos e gorduras alimentares e na indústria farmacêutica e química fina).

(1) Hidrólise :

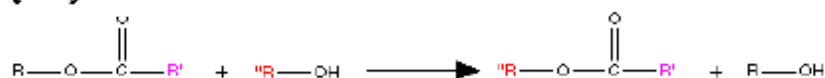


(2) Esterificação



(3) Transesterificação

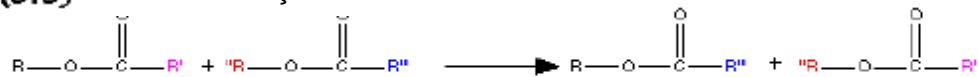
(3.1) Alcoólise :



(3.2) Acidólise



(3.3) Interesterificação



(3.4) Aminólise



Figura 3. Tipos de reacções catalisadas por lipases (Fonte: Saxena *et al.*, 1999).

Uma característica comum em algumas lipases microbianas, nomeadamente nas enzimas derivadas de *Rhizomucor miehei* e *Thermomyces lanuginosa* é a especificidade 1,3. Isto significa que nas reacções com os TAGs as mudanças estão confinadas às posições *n*-1 e 3 e o grupo acil *n*-2 permanece inalterado. Esta especificidade é frequentemente explorada na interesterificação enzimática (Figura 4).

Se for utilizada uma lipase não específica para catalisar a interesterificação, os triacilgliceróis produzidos serão semelhantes aos obtidos por interesterificação química. Com uma lipase 1,3-específica como catalisador da reacção, a migração do acilo está confinada às posições *n*-1 e *n*-3, e assim é produzida uma mistura de TAGs, que seria impossível obter através da interesterificação química (Macrae, 1983).

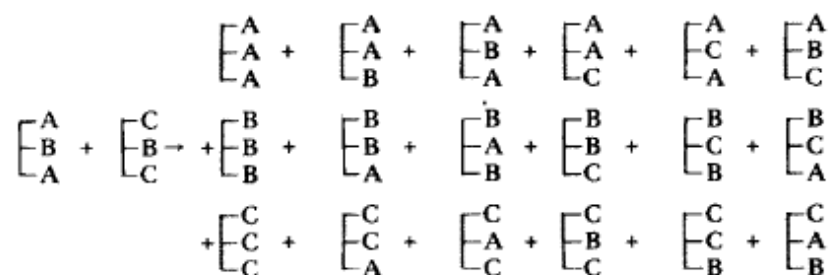
A especificidade e selectividade das lipases vai não só permitir a produção de óleos com a composição desejada, como também uma menor formação de produtos secundários.

Foi descrita a interesterificação enzimática da gordura de palma, fracções da gordura de palma, e outros óleos vegetais para dar origem a produtos que podem ser usados no fabrico da margarinas, com poucos ou nenhuns ácidos gordos *trans*.

Existem diversos artigos que demonstram como, com uma enzima adequada, os LCFA PUFA, como os EPA e/ou DHA, podem ser incorporados em óleos vegetais para conferir aos produtos um valor nutricional adicional.

Mistura de TAGS

(A) Com catalisador químico ou enzimático não específico.



(B) Com lipase 1,3-específica.

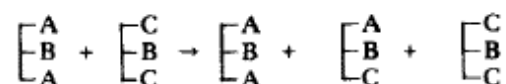


Figura 4. Reacção de interesterificação: (A) com catalisador químico ou catalisador enzimático não específico; (B) com lipase 1,3 específica (Fonte: Macrae, 1983).

A produção sustentável de óleos e gorduras é uma necessidade económica, devido ao aumento do custo das matérias primas e à sua menor disponibilidade (Cowan, 2008).

As reacções enzimáticas têm várias vantagens potenciais em relação a reacções similares com catalisadores químicos. Geralmente ocorrem a condições mais suaves de temperatura e com maiores rendimentos.

A análise do ciclo de vida do produto pode exprimir-se em termos de vários indicadores ambientais, nomeadamente: consumo energético, aquecimento global e poluentes produzidos. Através da análise do Quadro 1, podemos ter uma ideia do que podemos

poupar se optarmos por um processo de interesterificação enzimática em detrimento de um processo de interesterificação química (Cowan, 2008).

Quadro 1. Poupança a nível ambiental, por unidade de produção (1000 kg produto processado), ao optar pela interesterificação por via enzimática em detrimento da interesterificação química (Cowan, 2008).

Energia Fóssil (MJ)	280
Aquecimento global (kg CO ₂)	23
Acidificação do Solo (g SO ₂)	61
Enriquecimento da água em nutrientes (g PO ₄) – causador do fenómeno de eutrofização	58
Formação de fumo (g C ₂ H ₄)	4

O uso de lipases imobilizadas na interesterificação enzimática facilita o desenvolvimento dos processos comerciais, contínuos e em larga escala. Os sistemas em larga escala têm uma alta eficiência por unidade de volume do reactor e uma alta taxa de retorno dos custos relativos ao capital investido (Chibata e Tosa, 1976).

Para além disso, o uso de reactores com lipases imobilizadas diminui o potencial de contaminação do produto, pela presença de lipases residuais no produto; a técnica de imobilização melhora a estabilidade térmica e química das enzimas e abre oportunidades para um melhor controlo do processo e da qualidade do produto (Khmelnitsky *et al.*, 1988; Messing, 1975).

Para as reacções de interesterificação, os reactores descontínuos com agitação e as lipases imobilizadas, têm sido muito usados a nível laboratorial e industrial, porque são extremamente versáteis e fáceis de operar (Marlot e Landgrand, 1985; Macrae, 1985). A utilização de agitação magnética evita os gradientes de temperatura e concentração dentro do reactor. Contudo, pode levar à destruição das partículas do biocatalisador, em situações de agitação muito intensa. Depois da reacção estar concluída, a separação da lipase imobilizada da mistura reaccional é feita através de uma simples filtração (Malcata *et al.*, 1990).

Como resultado de uma estratégia de marketing eficiente, o processo de interesterificação enzimática está a ser gradualmente adoptado e, a nível mundial, 22 unidades de interesterificação enzimáticas foram, ou estão a ser construídas (Cowan et *al.*, 2009). Estas unidades utilizam (4 ou mais) reactores de leito fixo em série.

O reactor de leito fixo consiste num cilindro, geralmente colocado na vertical, preenchido com as partículas do biocatalisador. A alimentação é feita pela parte superior ou inferior da coluna. O movimento permanente do substrato através do leito contendo as células ou as enzimas imobilizadas permite obter velocidades de reacção elevadas resultantes de uma elevada concentração do substrato. Apresenta ainda como vantagem uma destruição mínima das partículas do biocatalisador, devido à abrasão resultante do atrito, quando comparada com a observada nos tanques agitados (Osório, 2008).

No primeiro dos reactores em série são removidos os compostos inactivadores enzimáticos presentes no caudal de alimentação. Desse modo, o biocatalisador está protegido nos reactores a jusante e evita-se que este tenha de ser substituído numa fase inicial. Para a remoção dos compostos inactivadores enzimáticos generalizou-se o uso da sílica (Dayton e Santos, 2008).

2.3 PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM A ACTIVIDADE E ESTABILIDADE ENZIMÁTICAS

Existem vários factores que influenciam a actividade e a estabilidade das enzimas, e neste caso em particular das lipases, destacando-se pela sua importância: a temperatura, a actividade da água (a_w), a pressão e a presença de compostos inibidores da actividade enzimática. (e.g. produtos de oxidação lípidica e ácidos gordos livres) (Wisdom *et al*, 1987; Linfield, 1988; Posorke *et al.*, 1988; Wang e Gordon, 1991, Correia e Ferreira-Dias, 1998; Xu *et al*, 1998).

Temperatura

A temperatura é um parâmetro que devemos ter em consideração sempre que temos como principal objectivo o aumento da velocidade de uma reacção enzimática. O aumento da temperatura promove a actividade catalítica das enzimas, mas a partir de um dado valor provoca a sua inactivação reversível ou irreversivelmente (Martinek *et al*, 1981; Ahern e Klibanov, 1985).

Assim, à medida que o tempo decorre, a lipase perde a actividade, devido à inactivação térmica. Uma questão importante associada ao uso a longo prazo de uma lipase num biorreactor industrial é como lidar com a sua inactivação térmica, já que a viabilidade económica do processo industrial depende do tempo de vida útil do biocatalisador, que está por sua vez directamente associado à temperatura da reacção e à termo-resistência da enzima (Bailey e Ollis, 1986).

A temperatura a que decorre a reacção de interesterificação deve aumentar a uma taxa que compense o decréscimo na actividade enzimática, permitindo ao sistema manter constante a actividade catalítica (Dohan *et al.*, 1978).

Nas reacções enzimáticas, à medida que a temperatura aumenta, observa-se um efeito conjugado do aumento da velocidade da reacção e da aceleração da taxa de desnaturação da enzima (Malcata *et al*, 1990). Existe um valor de temperatura óptimo, a partir do qual a velocidade de reacção decresce com o aumento da temperatura (Campos, 1998).

O aumento da temperatura para valores extremos pode desnaturar completa e irreversivelmente as lipases. A causa mais comum para inactivação das enzimas a temperaturas elevadas é a perda da conformação original cataliticamente competente, i.e., a termodesnaturação.

Demonstrou-se que a temperatura a que uma proteína sofre desnaturação térmica está dependente da a_w : quanto mais baixa a a_w , mais elevada a temperatura de desnaturação (Turner *et al.*, 1995). As enzimas que requerem baixa a_w para a sua actividade catalítica, permanecem activas a temperaturas elevadas, estando protegidas contra a desnaturação.

Não é fácil determinar a temperatura à qual uma dada enzima vai sofrer desnaturação. Para a maioria das enzimas este processo inicia-se entre os 40 - 50 °C (Bailey e Ollis, 1986). Existem no entanto enzimas termo-resistentes, como por exemplo as preparações comerciais das lipases imobilizadas de *Rhizomucor miehei* ("Lipozyme IM"), *Thermomyces lanuginosa* ("Lipozyme TL IM") e de *Candida antarctica* ("Novozyme 435"), produzidas pela Novozymes A/S, que desnaturam a temperaturas mais elevadas. A resistência térmica e elevada actividade destas enzimas, tornam-nas adequadas à bio-modificação de gorduras na ausência de solventes orgânicos.

Produtos de oxidação dos lípidos

O processo de auto-oxidação é o processo de oxidação induzido pela presença de oxigénio, à temperatura ambiente. Trata-se de um processo lento, que ocorre só até determinado grau. O oxigénio reage com os ácidos gordos insaturados. Inicialmente há formação de hidroperóxidos (produtos de oxidação primária) que podem dar origem a produtos de oxidação secundária, como as α -dicetonas ou cetonas α insaturadas, os aldeídos e os ácidos gordos de cadeia curta. A termoxidação, ou oxidação a temperatura elevada processa-se mais rapidamente que a auto-oxidação.

A oxidação dos óleos e gorduras vai desenvolver "off-flavours", designadamente o odor a ranço, proveniente da presença de produtos secundários de oxidação, que leva à rejeição dos produtos por parte do consumidor (Frankel, 1995).

Algumas gorduras são mais susceptíveis que outras, consoante o grau de insaturação, a presença de anti-oxidantes e outros factores, como por exemplo, a exposição à luz (fotoxidação). Quanto mais insaturada for a gordura ou o óleo, maior a sua susceptibilidade à oxidação rancificativa.

A determinação do teor dos produtos de oxidação é frequentemente elucidativa para quantificar a evolução do grau de oxidação da gordura.

A actividade e estabilidade das lipases diminuem na presença de produtos de oxidação, nomeadamente dos hidroperóxidos (Correia e Ferreira-Dias, 1998; Xu *et al.*, 1998).

A utilização de gorduras polinsaturadas, e por isso mais susceptíveis à oxidação, pode levar a uma diminuição da actividade e estabilidade operacional das lipases quando utilizadas em reactores contínuos (Osório *et al.*, 2006).

O principal desafio, ao incorporar TAG enriquecidos em PUFAs em produtos alimentares, é manter a sua estabilidade oxidativa, de modo a evitar que surjam “off-flavours”, durante o processamento ou armazenamento dos mesmos (Ferreira-Dias, 2009).

Actividade da água

A actividade da água (a_w) é uma medida da água disponível no sistema e corresponde à relação entre a pressão de vapor de água desse sistema e a pressão de vapor pura no ar saturado à mesma temperatura (Parker e Birch, 1983).

A interacção entre uma enzima e a água que a rodeia são de importância crucial para a catálise enzimática (Kuntz e Kauzmann, 1974), uma vez que a água influencia a manutenção da estrutura da enzima e o seu funcionamento.

A remoção total da água numa preparação enzimática vai alterar a conformação da enzima e inactivá-la.

As lipases são enzimas que apresentam uma cinética de activação interfacial na interface lípido-água. Este fenómeno ocorre devido às características estruturais únicas desta classe de enzimas. As lipases contêm uma unidade constituída por um oligopéptido helicoidal, que protege o centro activo. Esta protecção abre de forma a expor o centro activo, quando interage com uma interface hidrofóbica (lípidos), permitindo o livre acesso ao substrato (activação interfacial) (Reetz, 2002).

Ao nível molecular, o mecanismo de interesterificação envolve a hidrólise da molécula de éster, seguida de uma reacção de re-esterificação. Ou seja, é necessário que a água esteja presente pelo menos em quantidades vestigiais, adsorvida às partículas da lipase (sistema microaquoso) (Macrae, 1983). Por outro lado, valores de a_w elevados (≈ 1), em que a água constitui uma fase separada do meio orgânico, promovem a reacção de hidrólise.

Quando se utilizam lipases imobilizadas para catalisar uma reacção de interesterificação é necessário ter em linha de conta a a_w necessária para se obter a actividade máxima. Diferentes enzimas têm exigências diferentes em relação à a_w que necessitam para manter um nível apreciável de actividade catalítica. Para algumas lipases, a a_w tem de ser

aproximadamente 1, mas outras lipases como por exemplo, a do *Rhizomucor miehei*, demonstram uma actividade catalítica elevada para valores muito baixos (aproximadamente 0) e actividade catalítica óptima abaixo dos 0,5 (Halling, 2004).

A estabilidade das enzimas aumenta consideravelmente em meios com baixos níveis de actividade da água, tornando possível biotransformações a temperaturas mais elevadas que aquelas usadas em soluções aquosas convencionais (Aldercreutz, 1982).

A descoberta de que as enzimas podem ser usadas em meios orgânicos com baixo a_w expandiu o leque de aplicações potenciais das lipases. Apesar destes aspectos serem muito promissores para a biotecnologia, ainda existe uma grande lacuna relativamente ao comportamento enzimático em meio não aquoso.

Ácidos Gordos Livres

Tal como os outros ésteres, os TAGs podem ser hidrolisados por via química ou enzimática. A hidrólise parcial dos TAGs vai dar origem a MAGs, DAGs e AGL. Quando a hidrólise é completa formam-se apenas AGL e glicerol.

Existem estudos que referem a inactivação/inibição de lipases em presença de elevados teores de AGL (Dunn *et al.*, 1992). Contudo, outros estudos demonstram que os teores de AGL nos meios reaccionais sujeitos a interesterificação parecem não ter qualquer efeito negativo na estabilidade da enzima (Holm e Cowan, 2008).

Pressão

A pressão é um parâmetro fundamental do sistema, quando estamos na presença de reacções enzimáticas.

A aplicação de altas pressões provoca modificações locais ou globais na estrutura da proteína, e pode em última instância levar à desnaturação da mesma (Weber e Drickamer, 1983). Recentemente foi sugerido que as altas pressões poderão modelar a actividade e estabilidade de diferentes enzimas, conduzindo a melhores aplicações das mesmas (Mozhaev *et al.*, 1996).

A cinética e o equilíbrio das reacções enzimáticas podem diferir consideravelmente quando estas são levadas a cabo a altas pressões, e em alguns casos a selectividade e estabilidade da reacção podem ser também influenciadas.

As altas pressões e as altas temperaturas têm efeitos antagonistas em ligações fracas (ligações por pontes de hidrogénio, ligações iónicas e hidrofóbicas). É portanto expectável que a estabilidade das proteínas seja afectada de maneira diferente por estes dois parâmetros (Silva e Webber, 1993).

Aumentar a termoestabilidade das enzimas é um tema de grande interesse para as aplicações biotecnológicas, uma vez que a temperatura aumenta a velocidade das reacções (Grupta, 1991).

A alta pressão ainda não é um parâmetro utilizado para aumentar os rendimentos em processos biocatalíticos, principalmente pela instabilidade das enzimas a pressões elevadas.

De facto, a alta pressão tem sido aplicada com sucesso na indústria alimentar e farmacêutica pela sua acção desnaturante das enzimas e inactivadora de microrganismos. Uma aplicação importante na indústria alimentar é o processamento a altas pressões hidroestáticas (“High Pressure Process Technology”, HPP), uma técnica inovadora proposta para a estabilização microbiológica dos alimentos, e que vem surgir como alternativa aos tratamentos térmicos, como a pasteurização. O tratamento HHP inactiva microrganismos e desnatura enzimas, sem afectar grandemente os compostos de baixa massa molecular, como as vitaminas, os pigmentos e outros compostos relacionados com as qualidades sensoriais e nutricionais do produto.

No campo da enzimologia, a pressão pode ser usada para modificar o comportamento catalítico das enzimas, mudando o passo limitante ou modulando a selectividade da enzima (Okamoto et al, 1991). A pressão é capaz de afectar a estrutura proteica, a nível secundário, terciário e quaternário (Lullien-Pellerin e Balny, 2002). Em geral, pressões baixas induzem alterações reversíveis, ao passo que pressões acima dos 500 MPa podem desnaturar as proteínas irreversivelmente, na maioria dos casos, devido à sua agregação.

As pressões moderadas (<150 MPa) afectam a estrutura quaternária da proteína, devido às mudanças nas interacções hidrofóbicas que mantêm a estrutura das proteínas, e favorecem a dissociação das proteínas oligoméricas (Northrop, 2002).

Acima dos 200 MPa, observam-se alterações notáveis na estrutura terciária, mas a desnaturação reversível das proteínas pequenas monoméricas ocorre a pressões mais elevadas (400-800 MPa).

A estrutura secundária das proteínas é normalmente afectada por pressões acima dos 300 MPa. A modificação da estrutura secundária pode causar a desnaturação reversível da enzima, dependendo da taxa de compressão e da extensão dos rearranjos estruturais (Mohana-Borges *et al.* 1999).

Os seguintes estudos ilustram o efeito das altas pressões na catálise enzimática:

- A hidrólise da naringina, flavonóide responsável pela acidez nos sumos de toranja, catalisada por naringinase livre ou imobilizada em cápsulas de alginato de cálcio, foi levada a cabo a altas pressões. A 160 MPa, verificou-se um aumento na actividade e estabilidade operacional tanto da enzima livre, como imobilizada (Vila Real *et al.*, 2007; Pedro *et al.*, 2007).
- A utilização da lipase imobilizada de *Thermomyces lanuginosa* ("Lipozyme TL IMTM") como catalisador de reacções de interesterificação em meio livre de solvente: foi demonstrado que as altas pressões (50, 100 e 150 MPa) podem ser usadas para modificar a selectividade original das lipases, na direcção desejada (Osório, *et al.*, 2008).

2.4 MARGARINAS E CREMES DE BARRAR

A primeira margarina foi desenvolvida como resposta a um desafio lançado por Napoleão III em meados do séc. XIX, que pretendia uma gordura segura, barata e fácil de preservar, que substituísse a manteiga. O principal objectivo de Napoleão era alimentar a nova classe operária, assim como os exércitos.

Na realidade, foi o químico francês Hippolyte Mège-Mouriès quem respondeu ao desafio e estabeleceu em meados do séc. XIX, o processo original que permitia obter a partir de óleos no estado líquido, uma gordura sólida, que designou por “oleomargarina”.

Van den Bergh (Holanda) foi o responsável pela maior produção desta primeira geração de margarinas. No final do séc. XIX, a produção global de margarinas era de cerca de 300.000 toneladas (Parmentier, 2007).

A invenção do processo de hidrogenação, patenteado por Wilhelm Normann em 1902, impulsionou a produção, ao incluir na composição das novas margarinas, os óleos das principais oleaginosas (o óleo de soja em particular). A hidrogenação foi naquela época uma importante inovação a nível científico e tecnológico.

Contudo, a técnica de hidrogenação produzia produtos secundários indesejáveis, os isómeros *trans* dos ácidos gordos. No final do séc. XX, foram realizados estudos sobre o metabolismo destes isómeros e conclui-se que prejudicavam a saúde, a nível cardiovascular, porque aumentavam os níveis de colesterol LDL e baixavam os níveis de HDL. As autoridades passaram a impor limites no total de ácidos gordos *trans* presentes nas gorduras para alimentação humana.

Face a esta situação, surgiram duas alternativas: a primeira, melhorar a hidrogenação de forma a reduzir a produção de isómeros *trans*, através da monitorização da temperatura, pressão e tempo; e a segunda, a utilização de técnicas de interesterificação química ou enzimática.

Ao mesmo tempo, surgiram novos dados da investigação a nível nutricional, que destacavam o papel benéfico dos PUFA, e aumentou a procura de óleos vegetais ricos em ácido linoleico e ácido α -linolénico, e praticamente desprovidos de colesterol.

A resposta da indústria à procura dos consumidores por produtos mais saudáveis, foi o desenvolvimento de uma segunda geração de margarinas, com baixos teores de gorduras *trans* e incorporação de PUFA.

Os estudos nutricionais mais recentes apontam para uma nova mudança no comportamento dos consumidores, que procuram produtos seguros, e promotores da saúde (com uma função preventiva, por exemplo das doenças cardiovasculares). A este respeito, surgiu uma terceira geração de margarinas, ainda em desenvolvimento.

Exemplos desta abordagem são as margarinas e cremes de barrar que contém fitoesteróis para baixar os níveis de colesterol no sangue. Estas margarinas são comercializadas em larga escala nos países mais desenvolvidos. A adição destes compostos geralmente não afecta sensorialmente o produto. No entanto, a adição de PUFA de cadeia longa, de origem marinha, como o DHA e o EPA, às margarinas, pode causar problemas a nível da textura e do “flavour”.

Segundo a legislação europeia, as matérias gordas para barrar são produtos que se apresentam sob a forma de emulsão sólida e maleável, derivadas de matérias gordas vegetais e/ou animais, sólidas e/ou líquidas, próprias para consumo humano, cujo teor de matéria gorda de origem láctea não excede 3% do teor de matéria gorda.

Consoante o teor total de matéria gorda classificam-se em: (i) margarina, produto obtido a partir de gorduras e óleos vegetais e/ou animais, com um teor de matérias gordas entre 80% e 90%, com consistências variáveis; (ii) margarina três quartos, produto obtido a partir de matérias gordas de origem vegetal e ou animal, com um teor de matéria gorda mínimo de 60% e máximo de 62%; (iii) meia margarina, minarina ou halvarina, produto obtido a partir de matérias gordas de origem vegetal e/ou animal, com um teor de matéria gorda mínimo de 39% e máximo de 41%; (iv) creme para barrar X%, produto obtido a partir de matérias gordas de origem vegetal e/ou animal, com teores de matéria gorda (a) inferiores a 39%, (b) superiores a 41% e inferiores a 60% e (c) superiores a 62% e inferiores a 80%.

2.4.1 A TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO DE MARGARINAS E CREMES DE BARRAR

As margarinas são constituídas por uma fase aquosa e uma fase lipídica e podem ser caracterizadas como emulsões de água em óleo (A/O). A fase aquosa está finamente dispersa, na forma de gotas na fase contínua de gordura.

O processamento de margarinas e cremes de barrar pode ser dividido nos seguintes subprocessos: preparação da fase aquosa e da fase lipídica; preparação da emulsão, arrefecimento, cristalização e batadura; e embalagem e armazenamento (Figura 5).

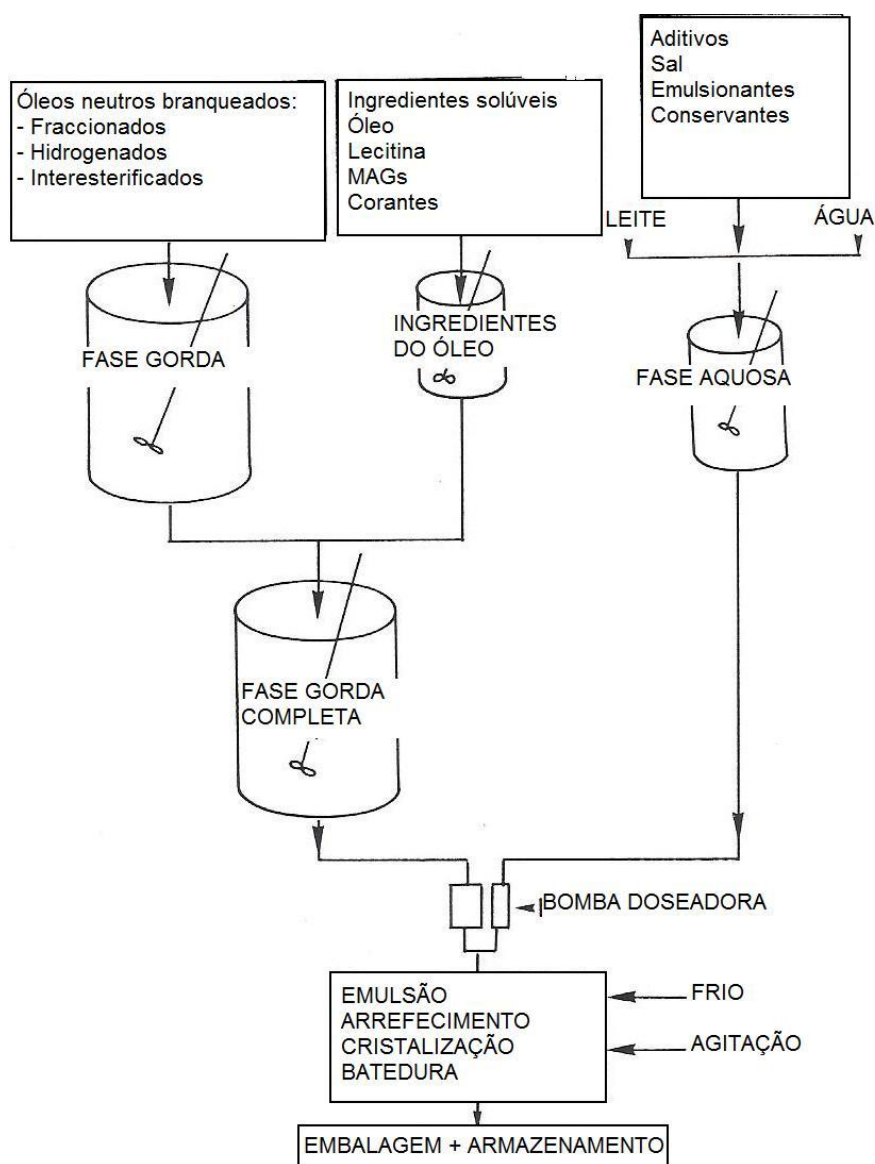


Figura 5. Esquema geral de fabrico de margarinas (Fonte: Faur, 1996).

Preparação da fase aquosa e da fase lipídica

A fase aquosa é preparada de forma descontínua num tanque. A água utilizada deve ser potável, e se necessário pode ser sujeita a um pré-tratamento (Young, 1983), por filtração ou radiação UV. Para além da água, a fase aquosa pode conter sal ou salmoura, proteínas do leite (margarina de mesa e cremes de barrar “light”), estabilizadores (cremes de barrar “light”), conservantes e aromatizantes solúveis em água.

O ingrediente maioritário da fase lipídica é a mistura de diferentes óleos e gorduras. Para conseguir margarinas com as propriedades funcionais desejadas, o rácio de gorduras e óleos na mistura é decisiva. Ao escolherem-se os óleos e gorduras, deve-se atender às

propriedades desejadas para o produto final: o ponto de fusão, a consistência, a plasticidade e a composição em ácidos gordos que vai condicionar a resistência à oxidação. É à fase lipídica que se adicionam as gorduras interesterificadas.

Os principais óleos vegetais utilizados são: óleos de coco e palmiste, gordura de palma, óleos de amendoim, soja, milho, girassol, algodão e o azeite. Os óleos de origem animal podem ser provenientes de animais marinhos e peixes (ricos em *n*-3 PUFA). As gorduras como a banha e o sebo (ricas em ácidos gordos saturados) são provenientes de animais terrestres. As características, como por exemplo o ponto de fusão dos óleos vegetais e marinhos, podem ser alteradas através de técnicas de modificação, como a hidrogenação, o fraccionamento e a interesterificação. Caso contrário, só poderíamos utilizar gordura de palma e gorduras de animais terrestres para o fabrico de margarinas com pontos de fusão entre 28 e 42 °C. Os vários óleos e gorduras, misturados ou isoladamente, são armazenados em tanques. São mantidos a temperaturas acima do seu ponto de fusão e sob agitação, de forma a evitar o fraccionamento da gordura e facilitar a sua manipulação.

Para além da mistura de gorduras, a fase lipídica é constituída também por ingredientes minoritários lipossolúveis como emulsionantes, lecitina, aromatizantes, corantes e antioxidantes. Estes ingredientes minoritários são dissolvidos na mistura de gorduras, antes da fase aquosa ser adicionada, e portanto, antes do processo de preparação da emulsão.

Preparação da emulsão

Os vários óleos e gorduras ou misturas de gorduras são transferidos para o tanque de preparação da emulsão. As gorduras com ponto de fusão mais elevado são adicionadas primeiro, seguidamente adicionam-se as gorduras com ponto de fusão mais baixo e finalmente os óleos. Para completar a preparação da fase lipídica, os emulsionantes e os outros ingredientes lipossolúveis minoritários são adicionados à mistura de gorduras. Quando todos os ingredientes da fase lipídica foram misturados adequadamente, a fase aquosa é adicionada e é criada a emulsão, sob agitação controlada mas intensa.

Pasteurização

Do tanque de equalização, a emulsão é bombeada continuamente e passa através de um permutador de calor, para que decorra o processo de pasteurização, antes da entrada na linha de cristalização. O processo de pasteurização decorre a 75-85 °C durante 16s e tem várias vantagens: assegura a inibição do crescimento bacteriano e de outros microrganismos, melhorando a estabilidade microbiológica da emulsão. Além disso, a pasteurização da emulsão assegura que a emulsão chegue à linha de cristalização a

temperatura constante, permitindo texturas de produto constantes. Ao pasteurizar a emulsão e ao bombeá-la através de uma bomba de alta pressão, a temperaturas 5-10 °C mais elevada que o ponto de fusão da fase lípidica, previne-se também a ocorrência de uma emulsão parcialmente cristalizada, quando esta chega ao equipamento de cristalização.

Arrefecimento, cristalização e batedura

A emulsão é bombeada para a linha de cristalização através de uma bomba de pistão de alta pressão. A emulsão é arrefecida e cristalizada na superfície do tubo de arrefecimento dos permutadores de superfície raspada.

À medida que os cristais se formam, são removidos das paredes das tubagens por raspadores. Quando a emulsão cristaliza, os cristais de gordura formam uma rede tridimensional, que retém as gotas de água e o óleo líquido, resultando num produto com propriedades plásticas semi-sólidas.

Embalagem e armazenamento

O produto é embalado e armazenado para posterior distribuição. Parte da estabilização física da margarina ocorre só depois de esta ter saído do permutador de calor de superfície raspada, podendo prolongar-se por mais do que algumas horas. Durante este período os cristais vão ligar-se, o que vai contribuir para a dureza do produto. Se uma margarina tiver forte tendência para formação de cristais β , os cristais β' inicialmente formados podem, sob determinadas condições de armazenamento, transformar-se na forma cristalina β . Esta transformação, traduz-se numa alteração de textura, mais granulosa, devido à presença de cristais de maior dimensão. Em casos mais extremos, esta transformação pode também resultar em exsudação de óleo do produto e coalescência parcial da fase aquosa, o que aumenta a susceptibilidade microbiológica. Uma forma de evitar este problema é reduzir a temperatura de armazenamento para 0 °C (Chryson, 1985).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Biocatalisadores

Os biocatalisadores utilizados foram as preparações comerciais de lipases termoestáveis, imobilizadas em resinas sintéticas, gentilmente cedidas por Novozymes™, A/S, Bagsvaerd, Dinamarca: as lipases 1,3 selectivas de *Rhizomucor miehei* (“Lipozyme™ RM IM”) e *Thermomyces lanuginosa* (“Lipozyme™ TL IM”) e a lipase de *Candida antarctica* (“Novozym™ 435”).

Foi também usada a lipase/aciltransferase de *Candida parapsilosis*, produzida por sobre-expressão do gene correspondente em *Pichia pastoris*, conforme descrito por Brunel *et al.* (2004). A produção, purificação e imobilização desta enzima em Accurel MP 1000 foi realizada pelo grupo do Prof. E. Dubreucq, SupAgro, Montpellier, França.

Substratos

Foi preparada uma mistura reaccional, de igual composição para todos os ensaios: 45 % (m/m) de óleo de palmiste (“palm kernel oil”, PK), 45 % (m/m) de estearina de palma (“palm stearin”, PS) e 10% (m/m) de um concentrado comercial de TAGs enriquecido em ω -3 PUFA (“EPAX 4510 TG”).

A gordura de palmiste e a estearina de palma, previamente refinadas, branqueadas e desodorizadas, foram gentilmente fornecidas pela FIMA/VG, Produtos Alimentares, Portugal; o concentrado comercial de TAG enriquecido em *n*-3 PUFA, “EPAX 4510TG”, foi doado pela Pronova Biocare, Sandefjord, Noruega.

- **Estearina de Palma**

O óleo de palma é extraído do mesocarpo do fruto da palmeira *Elaeis guineensis* L.. A estearina de palma é a fracção mais sólida obtida por fraccionamento deste óleo, após cristalização a temperatura controlada. É uma fonte natural de gordura sólida, por ser rica em ácidos gordos saturados e pode ser utilizada no fabrico de produtos como “shortenings”, margarinas, cremes de barrar e em produtos de pastelaria. O seu valor comercial é baixo, o que explica a sua grande difusão pela indústria.

- **Óleo de Palmiste**

O óleo de palmiste é extraído da semente do fruto da palmeira *Elaeis guineensis* L.. A composição em ácidos gordos do óleo de palmiste é diferente da da gordura de palma: contém aproximadamente 82% ácidos gordos saturados (48% ácido láurico, 16% ácido mirístico e 8% de ácido palmítico) e 18% de ácidos gordos insaturados (15% ácido oleico e 3% ácido linoleico). Em climas temperados é sólido à temperatura ambiente, mas funde-se a valores de temperatura inferiores à corporal (Rognon, 1996). Pela sua riqueza em ácido láurico, tal como o óleo de coco, o PK é designado por gordura láurica.

- **Concentrado de Tracilgliceróis enriquecido em ω -3 PUFA (EPAX 4510 TG)**

O concentrado de TAG ricos em *n*-3 PUFA, “EPAX 4510 TG”, é produzido a partir de óleos de peixe seleccionados. Contém cerca de 80% PUFAs, dos quais 45% são EPA e 10% são DHA (65% ácidos gordos *n*-3 totais) (Product Sheet: EPAX 4510).

Reagentes e outros materiais

Os solventes utilizados foram todos de grau de pureza *pro analysis* e obtidos de diferentes fontes.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 ENSAIOS DE INTERESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA À PRESSÃO ATMOSFÉRICA

Os ensaios de interesterificação à pressão atmosférica e em descontinuo, decorreram em reactores cilíndricos de vidro de parede dupla, com capacidade de 100 cm³.

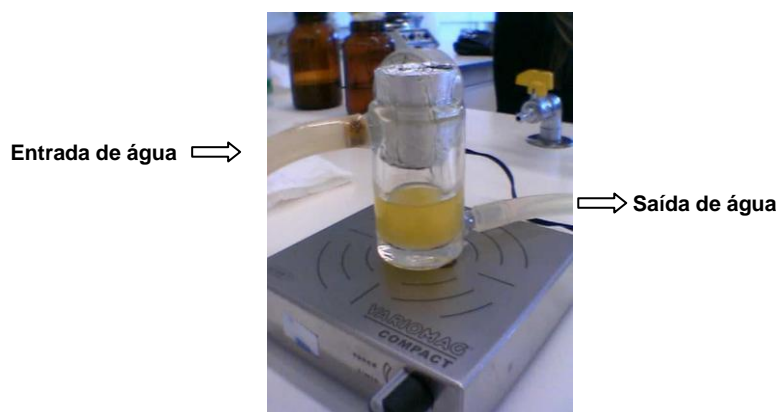


Figura 6. Reactor de vidro de parede dupla.

A manutenção da temperatura estável e controlada a 60 °C (erro aproximado de +/- 0,2 °C), foi conseguida através de um circuito fechado, com circulação de água no interior da parede dupla do reactor (Figura 6). A água foi aquecida através de um banho termostatzado.

Pesou-se 40 g do meio reaccional (composto pela mistura de PK, PS e EPAX 4510 TG). Após a fusão da gordura no reactor e toma de 5mL de meio reaccional (0,46g), adicionou-se 2g do biocatalisador (5,6% (m/m)) e a reacção iniciou-se de imediato, na ausência de solvente orgânico. Os reactores foram vedados com rolhas de borracha revestidas a folha de alumínio, a fim de evitar a entrada de oxigénio e assim minimizar as reacções de oxidação durante o processo. Retiraram-se amostras de 5mL (gordura + biocatalisador), mantendo-se o reactor sob agitação (nos ensaios com agitação) e colocando-se o mesmo sob agitação no momento da toma da amostra (nos ensaios sem agitação), de forma a que a proporção de gordura e enzima se mantivesse mais ou menos constante nas diferentes amostras. Ao longo de cada “batch” foram retiradas quatro amostras, sendo uma delas correspondente ao T₀ (antes do início da reacção), e as outras (T₁, T₂ e T₃) correspondentes à primeira, segunda e terceira horas de reacção. O T₀ serviu para comparação das propriedades da mistura de gorduras antes e depois do processo de interesterificação.

Cada toma de 5ml foi filtrada num funil de vidro forrado com papel de filtro, numa estufa a 70°C, de forma a separar as partículas do biocatalisador do meio reaccional. A gordura foi recolhida para tubos de RMN e frascos de plástico, devidamente identificados, e armazenada a -18°C, para análises posteriores.

Foram realizados dois ensaios de interesterificação a 60°C e à pressão atmosférica com 3 horas de duração cada para a enzima “Novozym 435TM” (um dos ensaios com agitação e outro sem agitação para simular as condições dentro do reactor de altas pressões).

O biocatalisador e a mistura reaccional eram armazenados no frigorífico entre utilizações.

3.2.2 ENSAIOS DE REUTILIZAÇÃO DO BIOCATALISADOR À PRESSÃO ATMOSFÉRICA

Após 3h de reacção à pressão atmosférica, catalisada pela “Novozym 435TM”, em meio sob agitação magnética e em meio não agitado, o biocatalisador foi removido do meio reaccional, adicionado das porções retiradas ao longo do ensaio e utilizado num novo ensaio com meio fresco, nas condições descritas para o primeiro ensaio (*c.f.* 3.2.1.). A utilização sucessiva do mesmo biocatalisador foi feita em “6 batches”, o que totaliza 18h de utilização. A enzima foi reutilizada cinco vezes, de modo a averiguar a estabilidade operacional de cada biocatalisador.

3.2.3 ENSAIOS DE INTERESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA EM REACTOR DE ALTA PRESSÃO

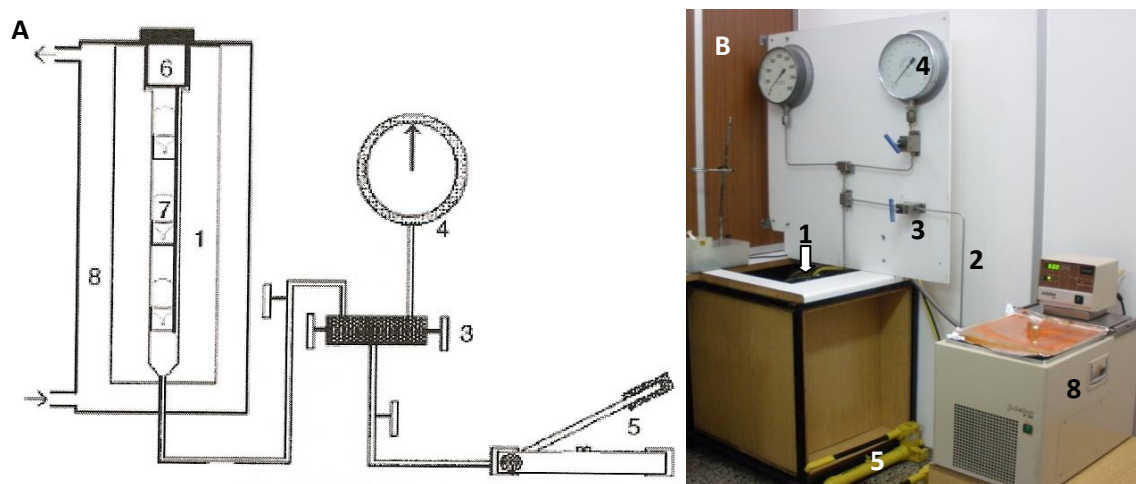


Figura 7. Esquema (A) e fotografia (B) do aparelho de alta pressão: vaso de altas pressões (1), tubo de aço (2), válvula (3), manómetro (4), bomba manual (5), bujão (6), células de reacção (7) e banho termostaticado (8).

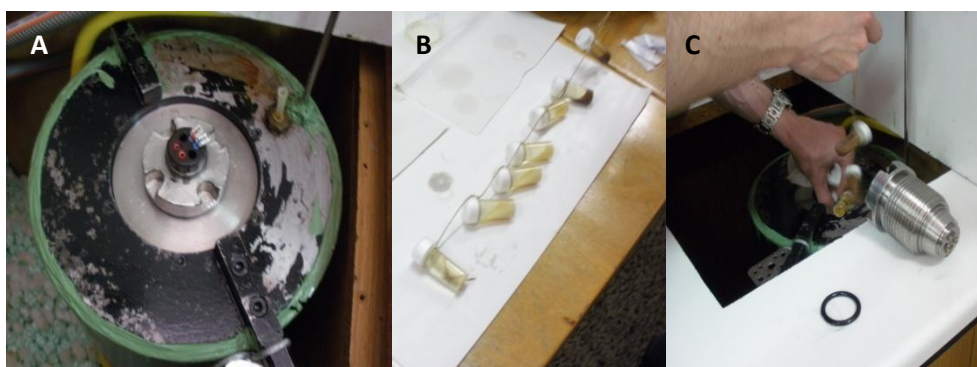


Figura 8. Vaso de altas pressões (topo) contendo óleo hidráulico Enerpac HF95Y (A); tubos de propileno com tampa de rosca e capacidade para 7mL de mistura reaccional (B); colocação dos tubos no reactor (C).

Os ensaios de interesterificação decorreram num vaso de altas pressões de aço inoxidável, imerso num banho de água termoestaticado, a 60 °C ($\pm 0,1$ °C) (Figura 7). Efectuaram-se ensaios às seguintes pressões: 25, 50 e 100 MPa (± 2 MPa).

O fluido de pressurização utilizado foi o óleo hidráulico (EnerpacHF95Y) e a pressão desejada era obtida com o auxílio de uma bomba manual (Enerpac, modelo P228) e controlada por um manómetro (Budenberg Gauge Co. Limited).

Em cada ensaio de interesterificação enzimática, as reacções decorreram em simultâneo em 6 tubos de polipropileno, resistentes às altas pressões, com uma capacidade de 7mL. Os 6 tubos, completamente cheios de mistura reaccional e hermeticamente fechados, de forma a impedir a entrada do óleo hidráulico, eram colocados na vertical, dentro do vaso das altas pressões, tal como é ilustrado na Figura 8. Dois dos tubos eram utilizados como controlo, e por isso só continham meio reaccional. Aos outros quatro tubos eram adicionadas as lipases imobilizadas (na proporção de 5,6% (m/m) relativamente à massa de meio reaccional) : “LipozymeTM RM IM”, “LipozymeTM TL IM” , “NovozymTM 435” e a lipase/aciltransferase de *Candida parapsilosis* imobilizada em Accurel MP 1000.

Cada *batch* durava 3 horas, tal como nos ensaios à pressão atmosférica. De modo análogo, a mesma enzima foi reutilizada cinco vezes, de modo a testar a estabilidade dos biocatalisadores. Um dos tubos de controlo permanecia ao longo dos 6 *batches*.

Quando o *batch* terminava, baixava-se a pressão do vaso lentamente e o meio reaccional era separado do biocatalisador por filtração em papel numa estufa a 70 °C. Todas as amostras eram armazenadas a -18 °C para análises posteriores.

O biocatalisador recuperado e a mistura reaccional eram guardados no frigorífico entre cada utilização a -4 °C.

O tempo de reacção, a composição da mistura reaccional e a carga de biocatalisador foram exactamente as mesmas que as usadas no ensaios à pressão atmosférica, de forma a que fosse possível comparar os resultados.

3.2.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE GORDURA SÓLIDA A 35 °C

Tal como na indústria alimentar, o seguimento da interesterificação da mistura de gorduras foi feito indirectamente através da determinação do teor de gordura sólida a 35 °C (SFC_{35 °C}). O SFC foi determinado na FIMA, Produtos Alimentares, Lda, através da técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) por impulsos, num espectrofotómetro Minispec mq 20, da Bruker, como definido pelos padrões internacionais (ISO 8292:1991).

Para determinar o SFC_{35 °C}, prepararam-se as amostras previamente: a gordura foi exposta a uma sequência pré-definida de binómios tempo-temperatura.

- Primeiro, procedeu-se à fusão da amostra, num banho a 60 °C, durante aproximadamente 10 minutos, com o objectivo de destruir qualquer forma de cristal ou gordura sólida.
- Em seguida, arrefeceu-se a gordura até à sua cristalização completa, num banho a 0 °C, durante 60 minutos.
- Finalmente, os tubos foram mantidos à temperatura à qual a leitura ia ser realizada, 35 °C.

O SFC_{35 °C} é como já foi referido, um atributo muito importante nas margarinas de mesa, e deve ser o mais baixo possível, de forma a que não ocorra uma sensação desagradável na boca, provocado pela textura arenosa e granulosa da gordura.

Para cada tempo de reacção, t, a percentagem de redução de SFC_{35 °C} foi calculado através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Redução SFC a } 35^{\circ}\text{C} = \left(\text{SFC}_0 - \frac{\text{SFC}_t}{\text{SFC}_0} \right) * 100 \quad (\text{eq. 1})$$

onde,

SFC₀: SFC_{35 °C} da mistura reaccional inicial

SFC_t: SFC_{35 °C} da mistura reaccional após o final de um tempo t de interesterificação

Considera-se que a actividade apresentada pelo biocatalisador ao fim do primeiro “batch” é a sua actividade máxima, nessas condições reaccionais (100%). Assim, a actividade residual ao final de cada “batch” será calculada através da seguinte expressão:

$$A(\%) = \left[\frac{\% \text{ Red. SFC a } 35^{\circ}\text{C Batch } n}{\% \text{ Red. SFC a } 35^{\circ}\text{C Batch } 1} \right] * 100 \quad (\text{eq.2})$$

onde,

A (%): actividade relativa do biocatalisador no final do “batch” n, expressa em percentagem,

% Red. SFC a 35 °C Batch n: percentagem de redução de SFC_{35 °C} no final do “batch” n,

% Red. SFC a 35 °C Batch 1: percentagem de redução de SFC_{35 °C} no final do “batch” 1.

3.2.5 DETERMINAÇÃO DOS ÁCIDOS GORDOS LIVRES

O teor de ácidos gordos livres (AGL) das amostras foi determinado seguindo o procedimento indicado pela Norma Portuguesa de determinação da acidez em óleos e gorduras comestíveis – (NP-903).

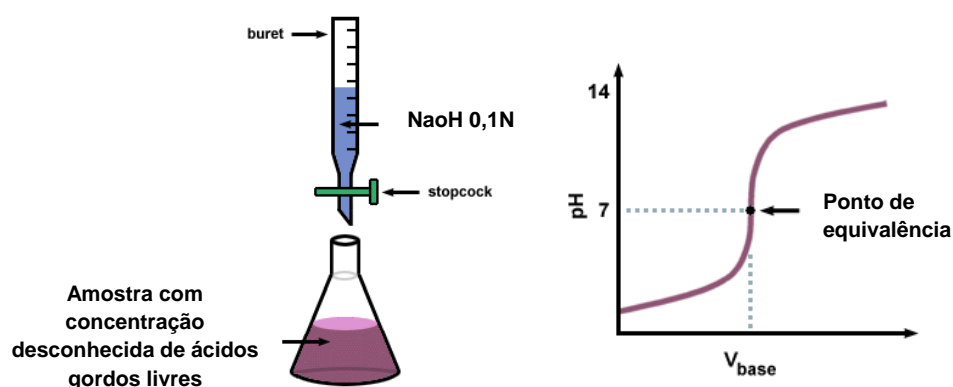


Figura 9. Ponto de viragem da titulação dos ácidos gordos livres presentes na amostra com uma solução de NaOH 0,1 N, identificável pelo aparecimento de um tom rosa pálido [2].

Cada amostra foi fundida numa estufa a 70 °C e pesou-se cerca de 1 g de toma de amostra. Essa toma foi dissolvida em 50 mL de uma mistura de solventes (éter etílico e etanol a 95%, mistura 1:1 (V/V)). O etanol foi previamente neutralizado.

De seguida, procedeu-se à titulação dos ácidos gordos livres presentes na amostra, com uma solução aquosa de NaOH 0,1 N, em presença do indicador fenolftaleína até ao ponto de equivalência (Figura 9).

A acidez (A) foi expressa em termos de percentagem de ácido oleico, e é igual a:

$$A = V * c * \frac{M}{1000} * \frac{100}{m} = \frac{V * c * M}{10 * m} \quad (\text{eq.3})$$

onde,

V : é o volume consumido, expresso em mililitro de solução titulada de NaOH,

c: é a concentração exacta, em mole por litro, da solução titulada de NaOH utilizada,

M: é a massa molar, em grama por mole, do ácido adoptado para a expressão dos resultados (igual a 282 para o ácido oleico),

m: é a massa, em grama da toma do ensaio.

Uma vez que se utilizou uma solução 0,1 N de NaOH para neutralizar ácido oleico, a fórmula vem:

$$A = \frac{2,82 * V}{m} \quad (\text{eq. 4})$$

3.2.6 DETERMINAÇÃO DOS PRODUTOS DE OXIDAÇÃO PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS

Os produtos de oxidação foram determinados por espectrofotometria no UV (Ultra Violeta), segundo a Norma Portuguesa – NP 970. A análise por espectrofotometria no UV pode fornecer indicações sobre a qualidade de uma matéria gorda, o seu estado de conservação e as modificações devidas ao processamento tecnológico.

A presença de produtos de oxidação primária (hidroperóxidos conjugados) e produtos de oxidação secundária (ácidos gordos livres, aldeídos e cetonas) é avaliada por espectrofotometria no UV a $\lambda = 232$ nm e $\lambda = 270$ nm, respectivamente. As absorvâncias nos comprimentos de onda previstos no método são devidas respectivamente à presença de sistemas diénicos e triénicos conjugados.

Pesa-se num balão aferido de 25 ml, cerca de 0,25 g da amostra fundida, completando o volume com o solvente, iso-octano para espectrofotometria, e homogeneiza-se. Enchem-se as *cuvettes* de quartzo com a solução obtida e medem-se as absorvâncias, usando como referência o solvente utilizado, nos seguintes comprimentos de onda: 232, 268, 270 e 272 nm. Os valores medidos devem estar preferencialmente no intervalo entre 0,1 a 0,8. Caso contrário, torna-se necessário repetir as medições recorrendo a soluções mais concentradas ou mais diluídas. Selecciona-se para valor de absorvância a 270nm, o maior dos valores de absorvância, medidos nos comprimentos de onda 268, 270 e 272nm, relativo aos produtos secundários de oxidação.

Os valores de absorvância são expressos em termos de extinção específica (extinção de uma solução de matéria gorda a 1g/100ml no solvente prescrito, para um percurso óptico de 1 cm), designado por K (coeficiente de extinção).

Exprimem-se as extinções específicas (coeficientes de extinção) nos diferentes comprimentos de onda, de acordo com a fórmula:

$$K = \frac{E}{c * s} \quad (\text{eq. 5})$$

onde,

K: extinção específica no comprimento de onda λ ,

E: extinção medida no comprimento de onde λ .

c: concentração da solução em g/ 100 ml.

s: espessura da tina em centímetros.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como foi referido anteriormente (c.f. 3.2.4) determinou-se o teor de gordura sólida a 35°C, para todas as amostras antes e após interesterificação, à pressão atmosférica e a altas pressões (25, 50, 75 e 100 MPa). A extensão da interesterificação foi avaliada indirectamente através da redução do teor de gordura sólida da mistura a 35 °C, depois da interesterificação. À temperatura de 35°C, próxima da temperatura corporal humana, é desejável um teor baixo em gordura sólida para que o produto final tenha a textura adequada, causando uma sensação agradável na boca. Um valor elevado de $SFC_{35^{\circ}C}$ confere ao produto uma textura grosseira indesejável.

4.1 EFEITOS DA AGITAÇÃO NA CINÉTICA DA REACÇÃO

A evolução dos valores de $SFC_{35^{\circ}C}$ do meio reaccional ao longo dos 6 “batches” sucessivos de interesterificação catalisados pela lipase comercial “Novozym 435™”, com e sem agitação, e que decorreram à pressão atmosférica, encontra-se representada na figura 10.

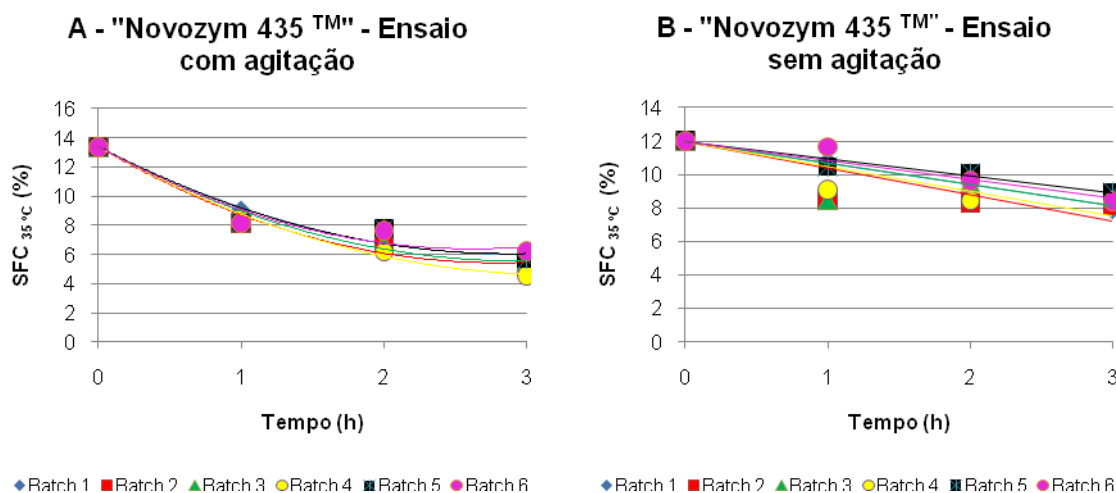


Figura 10. Evolução dos valores de $SFC_{35^{\circ}C}$ da mistura reaccional ao longo dos sucessivos “batches” de interesterificação catalisados pela “Novozym 435™”, com agitação (A) e sem agitação (B), à pressão atmosférica e a 60 °C.

A diminuição dos valores de $SFC_{35^{\circ}C}$ indica que a enzima testada é capaz de catalisar a interesterificação a 60 °C e à pressão atmosférica, com e sem agitação do meio reaccional (Figura 10). Estes valores de SFC foram utilizados para calcular a percentagem de redução do $SFC_{35^{\circ}C}$ ao longo das reacções, de acordo com a equação atrás mencionada (c.f. 3.2.4).

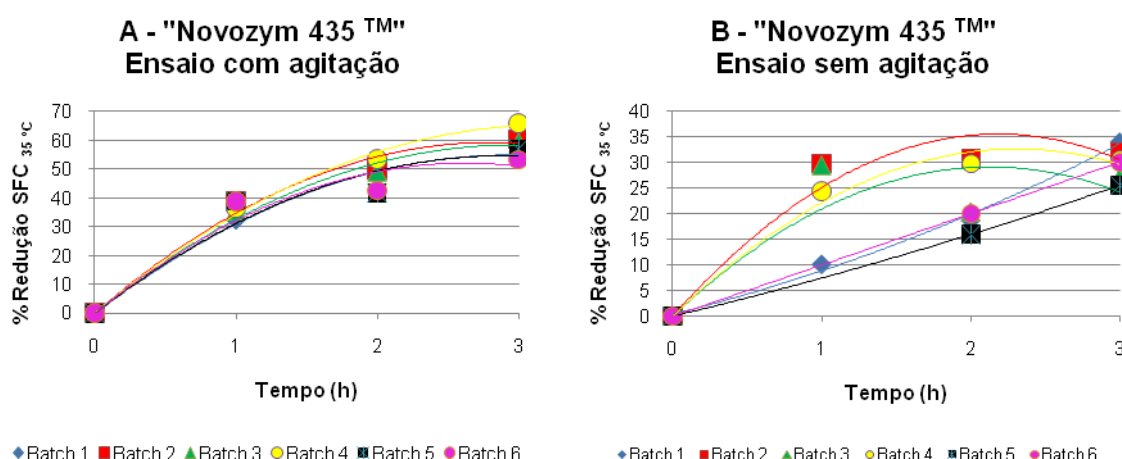


Figura 11. Evolução da percentagem de redução dos valores de $SFC_{35\text{ °C}}$ da mistura reaccional ao longo do tempo (h), durante as sucessivas utilizações da enzima "Novozym 435™" nos ensaios de interesterificação, com agitação (A) e sem agitação (B), à pressão atmosférica e a 60 °C.

Através da análise da figura 11, pode-se verificar ao longo das 6 utilizações de Novozym 435, que a percentagem de redução de $SFC_{35\text{ °C}}$ das misturas reaccionais foi menor nos ensaios sem agitação, o que se explica pela presença de limitações difusionais. Observou-se também um comportamento semelhante com os restantes biocatalisadores testados (Lopes, 2009).

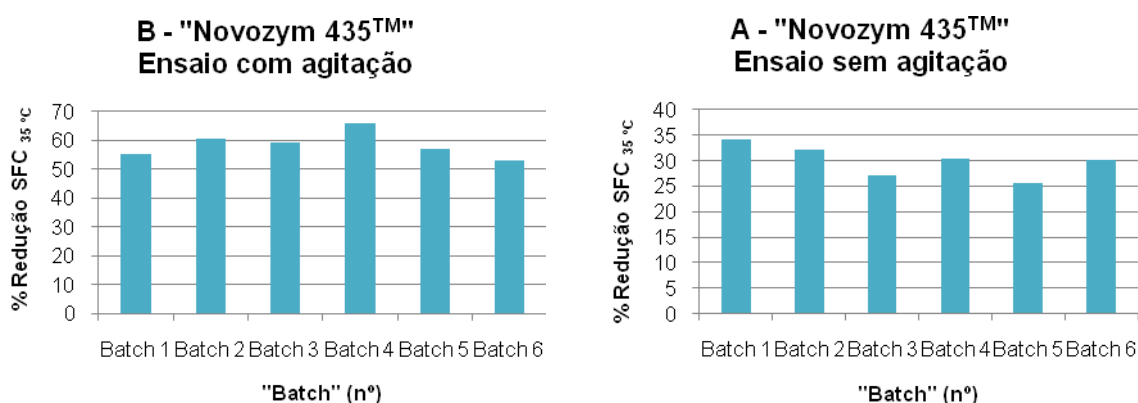


Figura 12. Evolução da percentagem de redução dos valores de $SFC_{35\text{ °C}}$ da mistura reaccional no final de cada "batch" de 3 horas, durante os ensaios de interesterificação, catalisados pela enzima "Novozyme 435™" com agitação (A) e sem agitação (B), à pressão atmosférica e a 60 °C.

A percentagem de redução de $SFC_{35\text{ }^{\circ}\text{C}}$ em ambos os ensaios, mantém-se aproximadamente constante no final de cada “batch” de 3 horas, o que permite concluir que a actividade catalítica da enzima se mantém (Figura 12).

4.2 EFEITOS DA PRESSÃO NA ACTIVIDADE DE INTERESTERIFICAÇÃO E NA ESTABILIDADE ENZIMÁTICA

Apresentam-se em seguida os resultados dos ensaios de interesterificação realizados com os quatro biocatalisadores testados, a 60 °C e a 25, 50 e 100 MPa (também a 75 MPa para *Candida parapsilosis*). Nas figuras 13 e 14 pode-se observar a evolução dos valores de $SFC_{35\text{ }^{\circ}\text{C}}$ das misturas reaccionais interesterificadas pelas diferentes lipases, após cada utilização de 3 horas às diferentes pressões, e as respectivas percentagens de redução. Em cada figura, são também apresentados os resultados dos ensaios à pressão atmosférica (0,1 MPa), sem agitação.

Relativamente à “Lipozyme RM IMTM”, o valor de $SFC_{35\text{ }^{\circ}\text{C}}$ no final do primeiro “batch” é semelhante para todas as pressões e ao longo dos “batches” seguintes verifica-se um aumento não muito acentuado do $SFC_{35\text{ }^{\circ}\text{C}}$ final (Figura 13 (A)). Parece tratar-se de uma enzima pouco sensível às variações de pressão, mas que diminui ligeiramente a sua actividade com o aumento da mesma (Figura 13 (B)).

A enzima “Lipozyme TL IMTM” não perde actividade catalítica, uma vez que os valores de $SFC_{35\text{ }^{\circ}\text{C}}$ mantêm-se praticamente constantes ao longo dos 6 “batches” (Figura 13 (C)). Esta enzima mantém-se activa ao longo das utilizações de 3h e sua actividade parece aumentar com o aumento da pressão (Figura 13 (D)).

O mesmo se verifica para a “Novozym 435TM”, uma vez que as misturas interesterificadas mantêm os valores de $SFC_{35\text{ }^{\circ}\text{C}}$ constantes no final das 5 reutilizações (Figura 14 (A)) e, à imagem da Lipozyme TL IM, a sua actividade catalítica parece aumentar com o aumento da pressão (Figura 14 (B)).

Com a lipase/aciltransferase de *Candida parapsilosis*, o valor de $SFC_{35\text{ }^{\circ}\text{C}}$ da mistura reaccional no final do 1º “batch” é semelhante para todas as pressões superiores à atmosférica e a percentagem de redução é menor que a. É de notar que o $SFC_{35\text{ }^{\circ}\text{C}}$ final da mistura interesterificada à pressão atmosférica sem agitação é superior e a percentagem de redução é menor que a das misturas submetidas a altas pressões.

Para esta lipase, a pressão parece ter um efeito activador da sua actividade. Contudo, ao longo dos “batches” seguintes, verifica-se um aumento linear do $SFC_{35\text{ }^{\circ}\text{C}}$, o que prova uma diminuição da actividade de interesterificação da enzima (Figura 14 (C)). Para as pressões de 25, 50, 75 e 100 MPa, verifica-se um decréscimo da sua actividade logo após o primeiro “batch” de 3 horas. Ao longo das 6 utilizações sucessivas do mesmo biocatalisador, a cada uma das pressões, observa-se uma diminuição linear da actividade catalítica (Figura 14 (D)).

Os valores de $SFC_{35\text{ }^{\circ}\text{C}}$ foram convertidos em actividade relativa, de modo a descrever a cinética de desactivação enzimática (c.f.3.2.4).

A figura 15 apresenta as actividades relativas de interesterificação de cada enzima nos ensaios à pressão atmosférica sem agitação e nos ensaios a altas pressões.

Pela análise da figura 15 (A) constata-se que a enzima “Lipozyme RM IMTM” se apresenta mais estável à pressão atmosférica. Para pressões mais elevadas (25, 50 e 100 MPa), a actividade relativa do biocatalisador decresce linearmente.

A “Lipozyme TL IMTM” parece manter a sua estabilidade operacional ao longo das sucessivas reutilizações quando sujeita a pressões superiores à atmosférica. Pelo contrário, verifica-se uma inactivação desta enzima quando actua à pressão atmosférica (Figura 15 (B)).

De acordo com a figura 15 (C), o comportamento da “Novozym 435TM” é muito semelhante ao da “Lipozyme TL IMTM”: a estabilidade operacional do biocatalisador parece aumentar com a pressão.

De acordo com a figura 15 (D), a manutenção da estabilidade operacional da lipase/aciltransferase de *Candida parapsilosis* é maior à pressão atmosférica. Às pressões de 25, 50, 75 e 100 MPa observa-se um decréscimo dessa estabilidade.

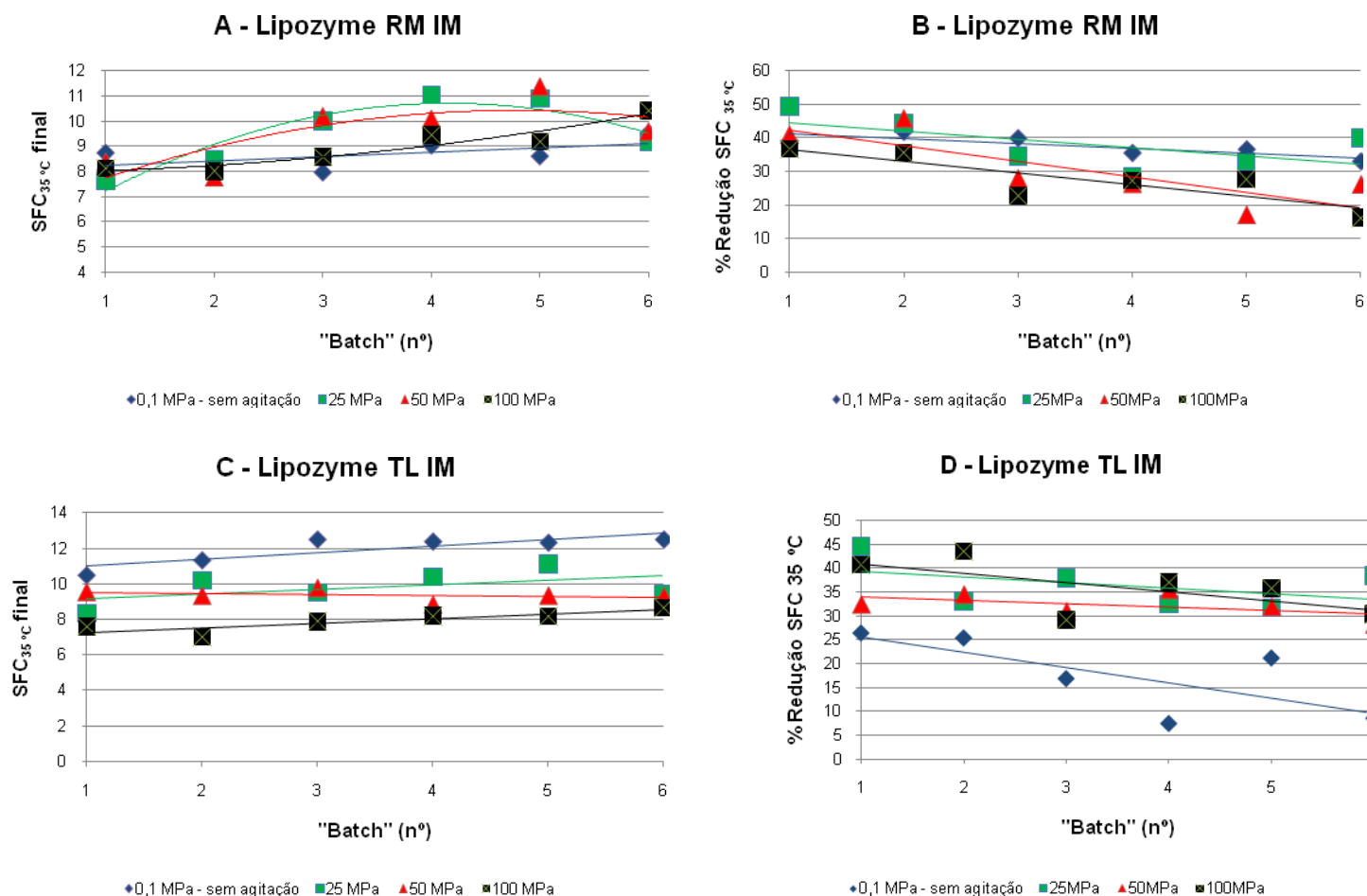


Figura 13. Valores de SFC_{35 °C} das misturas interesterificadas por “Lipozyme RM IM” (A) e “Lipozyme TL IM” (C), a diferentes pressões, após cada utilização de 3h e respectivas percentagens de redução de SFC_{35 °C} (B) e (D).

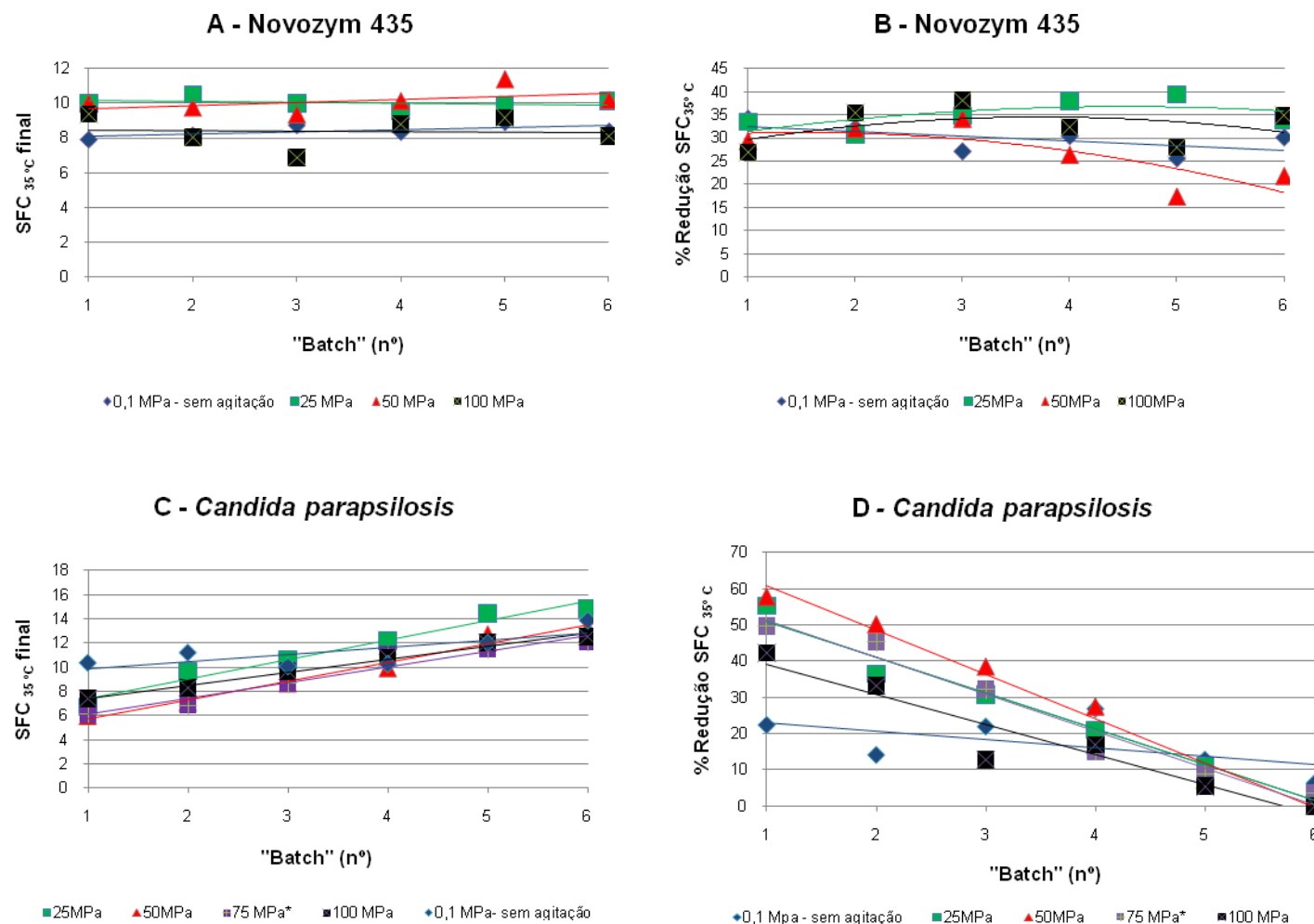


Figura 14. Valores de SFC_{35°C} das misturas interesterificadas por "Novozym 435" (A) e pela lipase/aciltransferase de *Candida parapsilosis* (C) a diferentes pressões, após cada utilização de 3h e respectivas percentagens de redução de SFC_{35°C} (B) e (D).

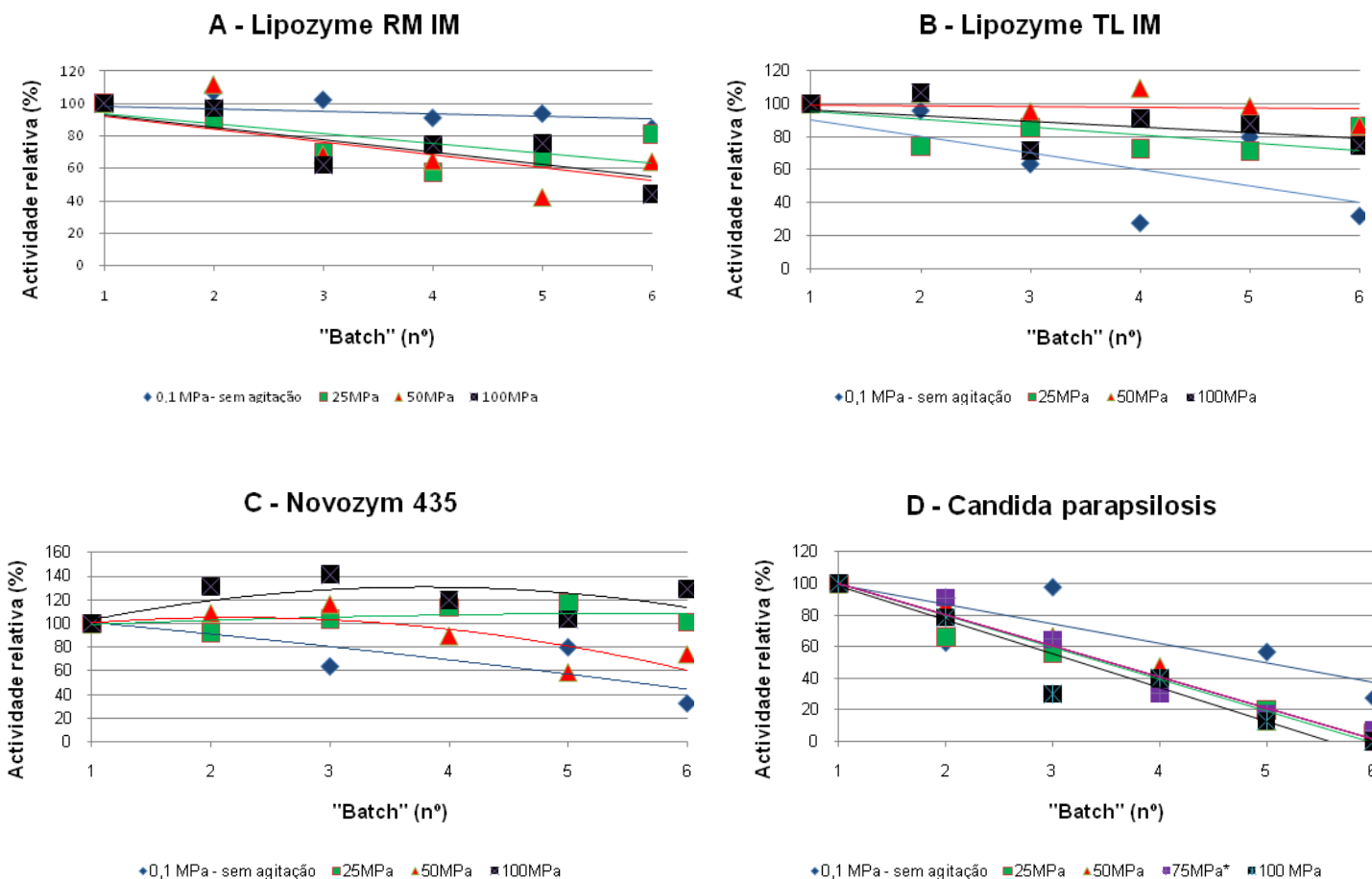


Figura 15. Actividade relativa de “Lipozyme RM IM”, “Lipozyme TL IM”, “Novozym 435” e da lipase/aciltransferase de *Candida parapsilosis* nos ensaios a 60 °C à pressão atmosférica, sem agitação, e nos ensaios a altas pressões (25, 50 e 100 MPa), (A) (B) (C) e (D) respectivamente.

4.3 EFEITO DA PRESSÃO NA REACÇÃO DE HIDRÓLISE

OS AGL são um produto da interesterificação enzimática. Esta reacção decorre geralmente em simultâneo com a reacção de hidrólise. A percentagem de AGL é um importante critério de qualidade: uma elevada percentagem neste tipo de compostos é indesejável, uma vez que contribuem para a formação de “off-flavors” (ranço) quando sofrem oxidação. No entanto, a produção de baixos teores de MAG e DAG pode ser benéfica para o fabrico de margarina. Os DAG podem ser usados como estabilizadores dos cristais β' , e os MAG (na concentração de 0,3%) são adicionados como emulsionantes nas emulsões óleo/água. Os teores de AGL presentes nas misturas reaccionais após cada reutilização das enzimas a 0,1, 25, 50 e 100 MPa, encontram-se representados na figura 16.

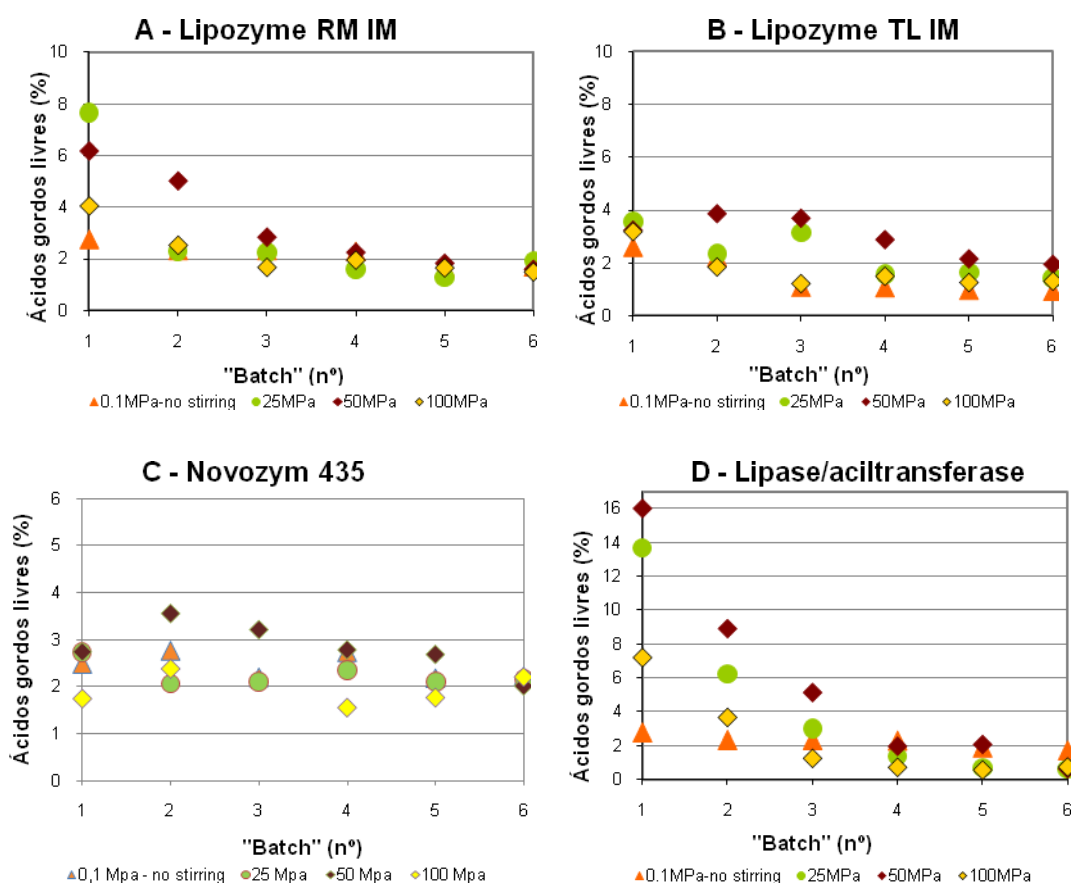


Figura 16. Evolução dos teores de ácidos gordos livres presentes nas misturas reaccionais, submetidas a reacções de interesterificação a 0,1 MPa e a altas pressões (25, 50 e 100 MPa), ao longo dos 6 “batches”, pelas enzimas “Lipozyme RM IMTM” (A), “Lipozyme TL IMTM” (B), “Novozym 435TM” e pela lipase/aciltransferase de *Candida parapsilosis* (C).

O teor de AGL é relativamente baixo nas misturas de gordura antes de serem submetidas à reacção de interesterificação ($\sigma = 0,18$). Ao fim do primeiro “batch”, o teor de AGL aumenta, o que traduz um favorecimento da reacção de hidrólise. Este facto pode ser explicado pela presença de água nos suportes de imobilização ou por uma maior actividade de interesterificação neste primeiro ensaio.

Para dois dos biocatalisadores testados, a “Lipozyme RM IMTM” e a lipase/aciltransferase de *Candida parapsilosis*, verifica-se uma diminuição do teor de ácidos gordos livres ao longo das diversas reutilizações, provavelmente devido ao consumo de água presente no próprio biocatalisador e, consequentemente à diminuição da extensão da reacção de hidrólise. Os altos teores de AGL nas misturas reaccionais interesterificadas pela lipase/aciltransferase (“batches” 1 e 2) devem-se ao a_w inicial de 0,97 deste biocatalisador (Osório *et al.*, 2009).

Para a “Lipozyme TL IMTM” e para a “Novozym 435TM”, o teor de ácidos gordos livres da mistura reaccional permanece praticamente constante ao longo dos 6 “batches”, com um valor médio de aproximadamente 2,3 e 2,7, respectivamente.

Os teores de AGL das misturas reaccionais interesterificadas à pressão atmosférica, são semelhantes àqueles observados nas misturas reaccionais interesterificadas a altas pressões.

4.4 EFEITO DA PRESSÃO NA OXIDAÇÃO DA MISTURA REACCIONAL

Os resultados dos produtos de oxidação primários e secundários durante os vários ensaios de interesterificação à pressão atmosférica, com e sem agitação, e a alta pressão, à temperatura de 60 °C, são apresentados nos quadros 2 e 3.

À pressão atmosférica, são apenas apresentados os valores dos produtos de oxidação presentes antes do início da reacção (“tempo zero”) e no final da primeira (3h) e da última (18h) utilização do biocatalisador (“tempo três do batch 1” e “tempo 3 do batch 6”). Nos ensaios à pressão atmosférica, verifica-se que as misturas reaccionais interesterificadas em reactor com e sem agitação têm teores muito semelhantes de produtos primários e secundários de oxidação. Também não ocorrem variações consideráveis nestes teores ao longo do tempo em que decorreram os ensaios, o que demonstra que a oxidação é desprezável.

Quadro 2. Teores de produtos primários e secundários de oxidação formados durante os ensaios de interesterificação à pressão atmosférica, catalisados por “Novozym 435TM”, em reactor, com e sem agitação, e à temperatura de 60 °C.

Ensaio	Amostra	Produtos de oxidação	
		Produtos primários	Produtos secundários
Com agitação	Tempo zero	4,4	1,4
	Batch 1 Tempo 3	4,4	0,4
	Batch 6 Tempo 3	4,2	0,4
Sem agitação	Tempo zero	4,1	1,4
	Batch 1 Tempo 3	4,6	0,4
	Batch 6 Tempo 3	4,1	1,4

Em relação aos ensaios a alta pressão, apresentam-se apenas os resultados das amostras referentes ao tempo zero, aos tubos de controlo que não continham enzima (“brancos”) e que foram sujeitos a cada pressão e à primeira e à última utilização dos diferentes biocatalisadores (Quadro 3).

Ao compararmos os quadros 2 e 3, apercebemo-nos que os valores das absorvâncias referentes à presença dos produtos primários e secundários de oxidação formados durante os ensaios a altas pressões são superiores aos valores correspondentes dos ensaios à pressão atmosférica. Este resultado pode ser explicado pelo facto de a pressão induzir uma modificação na estrutura da gordura por um mecanismo desconhecido que origina compostos que absorvam no mesmo comprimento de onda dos produtos de oxidação. Nos ensaios a altas pressões, o oxigénio disponível para a oxidação é apenas aquele que se encontra dissolvido na amostra, o que, no nosso entender, será um factor limitante da reacção. É interessante observar que os tubos de controlo que se mantiverem ao longo dos 6 “batches” (18h) a altas pressões apresentam valores mais altos de absorvância a 232nm (13,1; 18,8 e 18,1) e absorvância a 270nm (4,7; 5,8 e 5,6), mostrando que este fenómeno não está relacionado com a actividade enzimática, mas apenas com o aumento da pressão.

Quadro 3. Teores de produtos primários e secundários de oxidação, formados durante os ensaios de interesterificação à pressão atmosférica, catalisados por Lipozyme TLIM, Lipozyme RM IM, Novozym 435 e pela lipase/aciltransferase de *Candida parapsilosis*, em reactor de altas pressões, à temperatura de 60 °C.

Pressão	Amostra	Produtos de oxidação	
		Produtos primários	Produtos secundários
25 MPa	Lipozyme TL IM "Batch" 1	6,4	2,3
	Lipozyme TL IM "Batch" 6	5,3	2,4
	Lipozyme RM IM "Batch" 1	5,9	2,2
	Lipozyme RM IM "Batch" 6	8,0	2,5
	Novozym 435 "Batch" 1	7,8	2,6
	Novozym 435 "Batch" 6	6,4	2,3
	Lipase/aciltransferase "Batch" 1	8,3	2,8
	Lipase/aciltransferase "Batch" 6	5,9	1,9
	Branco	6,6	2,2
	Branco que se mantém ao longo dos 6 "batches"	13,1	4,7
	Tempo zero	3,6	1,4
50 MPa	Lipozyme TL IM "Batch" 1	4,5	2,6
	Lipozyme TL IM "Batch" 6	6,4	2,0
	Lipozyme RM IM "Batch" 1	7,6	2,5
	Lipozyme RM IM "Batch" 6	7,2	1,6
	Novozym 435 "Batch" 1	8,6	2,8
	Novozym 435 "Batch" 6	7,4	2,5
	Lipase/aciltransferase "Batch" 1	8,1	3,0
	Lipase/aciltransferase "Batch" 6	7,5	2,1
	Branco	11,2	1,8
	Branco que se mantém ao longo dos 6 "batches"	18,8	5,8
	Tempo zero	4,1	1,5
100 MPa	Lipozyme TL IM "Batch" 1	6,4	2,7
	Lipozyme TL IM "Batch" 6	6,9	2,1
	Lipozyme RM IM "Batch" 1	6,7	2,6
	Lipozyme RM IM "Batch" 6	6,3	2,3
	Novozym 435 "Batch" 1	6,9	2,6
	Novozym 435 "Batch" 6	7,4	2,5
	Lipase/aciltransferase "Batch" 1	7,0	2,0
	Lipase/aciltransferase "Batch" 6	6,9	2,1
	Branco	6,2	2,0
	Branco que se mantém ao longo dos 6 "batches"	18,1	5,6

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

No âmbito da presente tese, avaliou-se indirectamente o processo de interesterificação de uma mistura de gorduras (45% (m/m) PS, 45% (m/m) PK e 10% (m/m) EPAX 4510), à pressão atmosférica e a altas pressões, através da determinação do SFC pela técnica de RMN.

O biocatalisador “Novozym 435TM” demonstrou a sua capacidade para catalisar reacções de interesterificação à pressão atmosférica, com e sem agitação do meio reaccional, através da diminuição dos teores de gordura sólida a 35 °C da mistura reaccional. Ao longo das sucessivas reutilizações da enzima, o decréscimo nos valores de SFC_{35 °C} foi-se tornando menos evidente, devido à perda da actividade catalítica. A percentagem de redução do SFC_{35 °C} foi menor sem agitação, o que se explica pela presença de limitações difusionais.

As quatro enzimas (“Lipozyme RM IMTM”, “Lipozyme TL IMTM”, “Novozym 435TM” e a lipase/aciltransferase de *Candida parapsilosis*) que catalisaram os ensaios de interesterificação a 25, 50, 75 e 100 MPa, demonstraram que se mantém activas a altas pressões. Verificou-se que a actividade catalítica diminuía ligeiramente com o aumento da pressão para a enzima comercial “Lipozyme RM IMTM” e para a lipase/aciltransferase. Já para a “Novozym 435TM” e para a “Lipozyme TL IMTM” observou-se exactamente o oposto: um aumento da actividade catalítica com o aumento da pressão.

Em relação à estabilidade operacional, a enzima que se manteve mais estável ao longo das sucessivas reutilizações foi a “Lipozyme TL IMTM”. Pelo contrário, a enzima que perdeu mais rapidamente a sua actividade foi a lipase/aciltransferase.

A presença de ácidos gordos livres na mistura reaccional, provenientes do primeiro passo da interesterificação enzimática ou de hidrólise, tem sido um factor limitante na obtenção de melhores rendimentos, em comparação com o método de interesterificação química tradicional. Os teores de AGL das misturas reaccionais interesterificadas a altas pressões foram muito semelhantes aos teores de AGL das misturas reaccionais interesterificadas à pressão atmosférica. Como tal, pode-se concluir que a pressão não exerceu influência sobre este parâmetro.

Os teores de produtos primários e secundários de oxidação das misturas reaccionais interesterificadas a altas pressões foram superiores aos das misturas reaccionais

interesterificadas à pressão atmosférica. Pode-se concluir que o aumento da pressão, altera a estrutura da gordura através de um mecanismo desconhecido que origina compostos que absorvam no mesmo comprimento de onda dos produtos de oxidação.

O facto da mistura reaccional ser constituída, em 10%, por um concentrado rico em ácidos gordos *n*-3 PUFA, torna-a mais vulnerável à oxidação. Sugere-se que em trabalhos futuros, se incorporem compostos antioxidantes na mistura reaccional, a fim de minimizar a formação de produtos primários e secundários de oxidação.

Seria também interessante, para completar este trabalho, fazer a análise por cromatografia líquida de alta eficiência (“High Performance Liquid Chromatography”, HPLC) do perfil dos TAGs presentes nas amostras, a fim de esclarecer se ocorreram alterações na selectividade das enzimas e se obtiveram lípidos estruturados diferentes daqueles obtidos à pressão atmosférica.

Para finalizar, este estudo preliminar mostrou que a interesterificação catalisada por enzimas imobilizadas, pode ser uma alternativa ao processo tradicional de interesterificação química. Demonstrou também ser possível a realização da interesterificação enzimática mesmo em condições consideradas geralmente como desfavoráveis para a actividade enzimática. Este processo mais ecológico melhora a actividade enzimática; modifica a selectividade dos biocatalisadores e permite a obtenção de lípidos estruturados diferentes daqueles obtidos à pressão atmosférica.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahern, T. J., Klibanov, M., (1985). The mechanism of irreversible enzyme inactivation at 100°C. *Science*, **228**: 1280-1284.
- Akoh, C. C.(1998). Structured lipids. In: Akoh CC and Min DB, editors. Food lipids chemistry, nutrition, and biotechnology. New York: Marcel Dekker. pp.699-727.
- Bailey, J.E., Ollis, D.F., (1986), Applied enzyme catalysis. In: *Biochemical Engineering Fundamentals*, (Verma, K., Martin, C.C.), McGraw-Hill International Editions., pp.157-227.
- Bell, S.J., Macioli, E.A., Bistran, B.R., Babayan, V.K., Blackburn, G.L. (1991). Alternative lipid sources for enteral and parenteral nutrition: long- and medium-chain triglycerides, structured triglycerides, and fish oils. *J Am Dietetic Assoc* **91**(1):74-78.
- Birker, P. J. M. W. L., Padley, F. B. (1987). Physical properties of fats and oils. In: *Recent advances in chemistry and technology of fats and oils*, Edited by R.J. Hamilton and A. Bhati. Elsevier Applied Science, London & NY, pp.1-11.
- Calder, P.C.(2006), n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases, *The American Journal of Clinical Nutrition*, **83** (suppl):1505S-19S.
- Campos, L., (1998), Entender a Bioquímica: o metabolismo fundamental em animais e plantas, Escolar Editora, Lisboa, pp. 290.
- Chibata, I., Tosa, T. (1976). Industrial applications of immobilized enzymes and immobilized microbial cells. *Appl. Biochem. Bioeng.* 1:329.
- Chrysam, M.M. (1985). Table spreads and shortenings. In: *Bailey's industrial oil and fat products*. Edited by Thomas H. Applewhite. John Wiley & Sons, Inc., **3**: 41-89.
- Coenen, J.W.E. (1974) Modification of oils and fats. In: *The contribution of chemistry to food supplies*. Morton, I., Rhodes, D.N., eds. London: Butterworths, pp.15-54.
- Connor, W. E., (2000), Importance of n-3 fatty acids in health and disease, *Am J Clin Nutr*, **71** (1): 171s-175s.

- Correia, A.C., Ferreira-Dias, S., (1998), The effect of impurities of crude olive residue oil on the operational stability of the *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams, In: *Stability and Stabilization of Biocatalysts* (A. Ballesteros, F.J. Plou, Iborra, J.L., P. Halling, eds.), Elsevier, Amsterdam, pp. 71-76.
- Cowan, W.D., Yee, H.S., Hemann, J., Holm, H. C. (2009), *Influence of fatty acid composition on lipase efficiency in interesterification*. Paper presented at the AOCS Centenary Meeting & Expo, Orlando, abstr. pp. 119.
- Dayton, C. L. G., Santos, M. A.: US Patent Application Publication 2008/0138867 (2008).
- Deffense, E. (1985) Fractionation of palm oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **62** (2), pp.376-385.
- Deffense, E. (1993) Milk fat fractionation today: A review, *J Am Oil Chem Soc*, **70** (12), pp. 1193-1201.
- DeMan, J. M. (1999) Principles of Food Chemistry, aspen publication 3rd ed. chapter 2, pp.80 ISBN 0-8342-1234-X 1999.
- Dian, N. L. H. M., Sundram, K., Idris, N.A., (2007) *J Am Oil Chem Soc* **109**:147
- Dunn, I. J., Heinzle, E., Ingham, J., Prenosil, J.E. (1992). *Biological Reaction Engineering*, pp. 56-59.
- Erickson, M. D. (1995) Interesterification. In: *Practical handbook of soybean processing and utilization*. Edited by D. R. Erickson. AOCS Press and United Soybean Board, pp. 277-296.
- Faur, L. (1996). Interesterification Technology In: *Oils and fats Manual*. A. Karlsskind and J. P. Wolff, eds. Association Française pour l'Étude des Corps Gras. London, Paris & New York, pp. 923-995.
- Ferreira-Dias, S., (2009), Enzymatic Production of Functional Fats, In: *Food Biotechnology*, (A. Pandey, C. Larroche, C.R. Soccol, E. Gnansounou, P. Nigam, eds.), Asiatech Publishers Inc., New Deli (India).

- Frankel, E. N., (1995), Natural and biological antioxidants in foods and biological systems, Their mechanism of action, applications and implications, In: *Lipid Technology*, 77–80.
- Ghazali, H.M., Hamidah, S., Che Man, Y.B.(1995). Enzymatic transesterification of palm olein with nonspecific and 1,3-specific lipases. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **72**: 633-639.
- Giese, J.(1996). Fats,oils and fat replacers. In: *Food Technology*, pp.78-83.
- Gioielli, L. A. (1986) Modificações de óleos e gorduras por interesterificação. *Alimentação*, São Paulo, **82**, pp. 25-28.
- Gioielli, L. A., Baruffaldi, R. (1988) *Rev Bras Ciênc Farm* **24**:29.
- Goh, E.M., Ker, T.H. (1991) *J Am Oil Chem Soc* **68**:,144.
- Guilliams,T. G., (2000). Fatty acids: Essential...Therapeutic, *The Standard*, **3** (2): 1-8.
- Gunstone, F.D. (1998). Movements towards tailor-made fats. *Prog. Lipid Res.*, **37** (5): 277-305.
- Halling, P.J. (1992). Salt hydrates for water activity control with biocatalysts in organic media. *Biotechnol Tech*, **6**: 271-6.
- Halling, P.J. (2004). What can we learn by studying enzymes in non-aqueous media?, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **359**: 1287-1297.
- Hasler, C.M. (1998), Functional foods: their role in disease prevention and health promotion, *Food Techonol*, **52** (11): 63-70.
- Haumann, B.F. (1994) Tools: hydrogenation, interesterification. *INFORM*, 5(6) p.668- 678.
- Herrera, M.L., Falabella, C., Melgarejo, M., Anón, M.C. (1998) *J Am Oil Chem Soc* **75**: 1273.
- Hoffman, G. (1989) *The chemistry and technology of edible oils and fats and their high fat products*. London: Academic Press, pp.1-28.
- Holm, H.C., Cowan, D., (2008), The evolution of enzymatic interesterification in the oils and fats industry, *Eur.J.Lipid Sci.Technol.*, **110**: 679-691.

- Howlett, J. (2008), *Functional Foods: From Science to Health and Claims*. P. Aggett (eds.), *ILSI Europe publications*, pp.36
- Hustedt, H.H. (1976) Interesterification of edible oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **53** (6), pp.390-392.
- Jaeger, K-E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., van Heuvel, M., Misset, M., (1994), Bacterial lipases, *FEMS Microbiol. Rev.*, **15**: 29-63.
- Karabulut, I., Turan, S., Ergin, G., (2004) *Eur Food Res Technol* **218**: 224.
- Kellens, M. (2000) Interesterification: process conditions, *SCI Lecture Papers Series* **114**, pp.3 (<http://www.soci.org> (ISSN 1353-114 X))
- Khatoon, S. (2000), *J Food Lipids* **7**:83.
- Khmelnitsky, Y. L., Levashov, A., VKlyachko, N. L., Martinek, K. (1988) Engineering biocatalytic systems in organic media with low water content. *Enzyme and Microbial Technology* **10** (12), pp. 710-724.
- Kok, L. L., Fehr, W. R., Hammond, E. G., White, P. J. (1999), *J Am Oil Chem Soc* **76**: 1175.
- Kreulen, H.P. (1976) Fractionation and winterization of edible fats and oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **53** (6), pp.393-396.
- Kromhout, D., Bosschieter, E.B., Coulander, C.(1985), The inverse relation between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease. *N Engl. J Med*; **312**:1205-9.
- Larque, E., Zamora, S., Gil, A. (2001) Dietary *trans* fatty acids in early life: a review. *Early Hum Dev*; **65**(2):31s-41s.
- Lee, K.T., Akoh, C.C., (1998), Structured lipids: synthesis and applications, *Food Rev Int.*, **14**(1):17-34.
- Lida, A. M. D. N., Ali, A. R. (1998) *J Am Oil Chem Soc* **75**: 1625.

- Linfield, W. M., (1988), Enzymatic Fat Splitting In: *Proceedings of World Conference on Biotechnology for the Fats and Oil Industry*, (Apple White, T. H., ed.), Am. Oil Chem. Soc., Champaign, Il., USA, pp. 131-133.
- List, G.R., Emken, E.A., Kwolek, W.F., Dutton, H.J. (1977) *J Am Oil Chem Soc* **74**: 408.
- Lopes, A. R. (2009) Estudo do Efeito da Pressão na Cinética da Interesterificação de Gorduras Ricas em Ácidos Gordos Polinsaturados Ômega-3, Catalisada por Lipases Imobilizadas, Tese de Mestrado em Engenharia Alimentar, pp 1-42.
- Lullien-Pellerin, V., Balny, C. (2002). High pressure as a tool to study some proteins' properties: conformational modification, activity and oligomeric dissociation. *Innovative Food Science and Emerging Technology*, **3**, 209-221.
- Macrae, A.R., (1983), Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **60**: 291-294.
- Malcata, F.X., Reyes, H.R., Garcia, H.S., Hill, C.G., Amundson, H. (1990). Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils – a review. *JAOCS*, **67** (12): 890-910.
- Marangoni, A.G. (2005) In: *Fat crystal networks. Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. John Wiley & Sons. Marcel Dekker, New York, pp. 1.
- Marangoni, A.G., Rousseau, D. (1995) Engineering of Triacylglycerols: The role of interesterification, *Trends in Food Science & Technology*, **6** (10), pp. 329-335.
- Martinek, K., Semenov, A. N., A. N., Berezin, I.V. (1981). Enzymatic syntesis in biphasic aqueous-organic systems. *Biochim. Biophys. Acta*, **658**: 76:89.
- Martini, S., Herrera, M.L., Marangoni, A.G. (2005). *J Am Oil Chem Soc* **82**: 313.
- McGrady, J. (1993), Fats and oils. Presented at the IFT Short Course, "Ingredient Technology." Chicago, Ill., July 9-10.

- Messing, R. A.; *Immobilized enzymes for industrial reactors*, Academic Press: New York 1975.
- Mohana-Borges, R., Silva, J., Ruiz-Sanz, J., Prat Gay, G. (1999). Folding of a pressure-denaturated model protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**, 7888-7893.
- Mozhaev, V. V., Heremans, K., Frank, J., Masson, P. and Balny, C. (1996), High pressure effects on protein structure and function. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, **24**: 81–91.
- Nascimento, A.C., Tecelão, C.S.R., Gusmão, J.H., da Fonseca, M.M.R., Ferreira Dias, S., (2004), Modelling lipase-catalysed transesterification of fats containing *n*-3 fatty acids monitored by their Solid Fat Content, *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, **106**: 599-612.
- Nawar, W. W. Lipids. In: FENNEMA, O. R. (Ed.). *Food chemistry*. 3. ed. New York: M. Dekker, 1996. pp. 225-319.
- Northrop D. (2002) Effects of high pressure on enzymatic activity. *Biochem Biophys Acta*, **1595**: 71-9.
- O'Brien, R.D. (2004). Fats and oils. Formulating and processing for applications. 2nd Edition, *CRCpress*, Washington.
- Okamoto, M., Hayashi, R., Enomoto, A., Kaminogawa, S., Yamauchi, K. (1991) *Agricultural and Biological Chemistry*, **55**, 493-499.
- Osborn, H.T., Akoh, C.C., (2002), Structured Lipids - Novel fats with medical, nutraceutical, and food applications, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **3**: 93-103.
- Osório, N.M., da Fonseca, M.M., Ferreira-Dias, S., (2006), Operational Stability of *Thermomyces lanuginosa* Lipase during Fats Interesterification in Continuous-Packed-Bed Reactors, *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, **108**: 545-553
- Osório, N.M., Ribeiro, M.H., da Fonseca, M.M.R., Ferreira-Dias, S. (2008). Interesterification of fat blends rich in omega-3 polyunsaturated fatty acids catalysed by immobilized *Thermomyces lanuginosa* lipase under high pressure, *J. Molecular Catalysis- B Enzymatic*, **52-53**: 58-66.

- Parker, K. J., Birch, G. G., (1983). Control of food quality and food analysis. *Elsevier Applied Science Publishers*, London & New York, pp. 226-229.
- Parmentier, M. (2007), Formulation of margarines: up to the third generation and what beyond. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **109**, pp.1051-1052.
- Pedro, H.A., Alfaia, A.J., Marques, J, Vila-Real, H.J., Calado, A. T., Ribeiro, M.H.L. (2007). Design of na immobilized enzyme system for naringin hydrolisis at high-pressure, *Enz. Microb. Technol.*, **40**: 442-446.
- Petrauskaite V., De Greyt, W., Kellens, M., Huyghebaert, A. (1998) *J Am Oil Chem Soc* **75**: 489.
- Phillipson, B.E., Rothrock, D.W., Connor, W.E., Harris, W.S., Illingworth, D.R. (1985), Reduction of plasma lipids, lipoproteins and apoproteins by dietary fish oils in patients with hypertriglyceridemia. *N Engl J M*, **312**:1210-6.
- Pike, I. H., Jackson, A, (2010), Fish oil: production and use now and in the future. *Lipid Technology*, **22**: 59–61.
- Piska, I., Zárubová, M., Louzecký, T., Karami, H., Filip, V. (2006). *J Food Eng* **77**: 347.
- Posorske, L.H., LeFebvre, G.K., Miller, C.A., Hansen, T.T., Glenvig, B.L., (1988), Process considerations of continuous fat modification with an immobilized lipase, *J. Am Oil Chem. Soc.*, **65**: 922-926.
- Reetz, M. T., (2002) Lipases as practical biocataysts, *Current Opinion in Chemical Biology*, **6**: 145-150.
- Ribeiro, A. P. B., Basso, R. C., Grimaldi, G., Gioielli, L. A, Gonçalves, L.A.G. (2009) Instrumental Methods for the Evaluation of Interesterified Fats, *Food Anal. Methods* **2**: 282-302.
- Rozenaal, A. (1992) Interesterification of oils and fats. *INFORM*, **3**(11), pp.1232-1237.
- Rousseau, D., Hill, A.R., Marangoni, A.G. (1996). *J Am Oil Chem Soc* **72**: 983.

- Saxena, R. K., Ghosh, P. K., Gupta, R., Davidson, W. S., Bradoo, S, Gulati, R (1999) Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry. *Curr.Sci.* 77, pp. 101.
- Shahidi, F., Wanasundara, P. K. J. P. D. (2002) In: Akoh CC (ed) *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*. CRC, New York.
- Silva, J. L., Weber, G. (1993). Pressure stability of proteins, *Annual review of Physical Chemistry*, **44**: 89-113.
- Silva, R. C., Gioielli, L.A. (2006) *Rev Bras Ciênc Farm* **42**: 223
- Sonntag, N.O.V. (1979) Structure and composition of fats and oils. In: SWERN, D., ed. - *Bailey's industrial oil and fat products*. 4. ed. New York: Wiley-Interscience,v.1, p.1-98.
- Timms, R.E. (1985), *J Am Oil Chem Soc*, **62**: 241.
- Timms, RE (2003), Confectionery fats handbook. *The Oily Press*, Dundee, p 63.
- Toro-Vazquez, J. F., Dibildox-Alvarado, E., Charó-Alonso, M., Charó-Alonso, V., Gómez-Aldapa, C.A. (2002) *J Am Oil Chem Soc* **79**: 855
- Turner, N. A; Duchateau, D.B., Vulfson, E.N. (1995) Effects of hydration on thermostability on serine esterases. *Biotech Letts*, **17**: 371-6.
- Van Duynhoven, J., Goudappel, G.J., Gribnau, M.C.M., Shukla, V.K.S. (1999) *Inform* **10**: 479
- Van Putte, K., Van den Enden, J (1974). *J Am Oil Chem Soc* **51**: 316.
- Van Putte, K., Vermaas, L., Van Den Enden, J., Den Hollander, C. (1975). Relations between pulsed NMR, wide-line NMR and dilatometry. *JAOCS*, **52**: 179-181.
- Vila-Real, H.J., Alfaia, A.J., Calado, A.R.T., Ribeiro, M.H.L. (2007). High Pressure-temperature effects on enzymatic activity: Naringin bioconversion, *Food Chem.* **102**: 565-570.

- Wang, Y., Gordon, M.H., (1991), Effect of lipid oxidation products on the transesterification activity of an immobilized lipase, *J. Agric. Food Chem.*, **39**: 1693-1695.
- Wang, C., Harris, W.S., Chung, M., Lichtenstein, A.H., Balk, E.M., Kupelnick, B, Jordan, H. S., Lau, J. (2006), n–3 Fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not α -linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary- and secondary-prevention studies: a systematic review. *Am J Clin Nutr*, **84**: 5 -17.
- Weber, G., Drickamer, H. G. (1983). The effect of high pressure upon proteins and other biomolecules. *Quarterly Reviews of Biophysics*, **16**: 89-112.
- Weber, P.C. (1989), Are we what we eat? Fatty acids in nutrition and in cell membranes: cell functions and disorders induced by dietary conditions. Svanoybukt, Norway: Svanoy Foundation, report nº 4.,pp 9-18.
- Willis, W.M., Lencki, R. W., Marangoni, A. G., (1998), Lipid modification strategies in the production of nutritionally functional fats and oils, *Crit. Rev. Food Sci. Nutri.*, **38**:1-36.
- Wisdom, R.A., Dunnill, P., Lilly, M.D., (1987), Enymic interesterification of fats: laboratory and pilot-scale studies with immobilized lipase from *Rhizopus arrhizus*, *Biotechnology and Bioengineering*, **29**: 1081-1085.
- Xu, X., Balchen, S., Hoy, C.-E., Adler-Nissen, J. (1998a). Pilot batch production of specific-structured lipids by lipase-catalized interesterification: preliminary study on incorporation and acyl migration. *JAOCS*, **75** (2): 301-308.
- Xu, X., (2000), Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **102**: 287–303.
- Young, V. (1983). Margarine production. *American soybean*, pp. 66-73.

Cibergrafia:

[1] <http://www.iseo.org/FoodFatsOils2006.pdf>

[2] <http://img.sparknotes.com/figures/3/3a5994498f24d59f5d5d762b40844a2a/titsetup.gif>